

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Nanoresveratrol diminuiu EROs e LPO e aumenta
motilidade progressiva em espermatozoides
bovinos descongelados**

Pedro Sica Cruzeiro

Pelotas, 2019.

Pedro Sica Cruzeiro

Nanoresveratrol diminuiu EROs e LPO e aumenta motilidade progressiva em espermatozoides bovinos descongelados

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Prof. Dr. Tiago Collares

Coorientador: Prof^a. Dr^a. Fabiana Seixas

Pelotas, 2019.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

C955n Cruzeiro, Pedro Sica

Nanoresveratrol diminuiu EROs e LPO e aumenta motilidade progressiva em espermatozoides bovinos descongelados / Pedro Sica Cruzeiro ; Tiago Collares, orientador ; Fabiana Seixas, coorientadora. — Pelotas, 2019.

38 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Antioxidante. 2. Células espermáticas. 3. Citometria de fluxo. 4. Nanotecnologia. 5. Resveratrol. I. Collares, Tiago, orient. II. Seixas, Fabiana, coorient. III. Título.

CDD : 620.5

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares (UFPel, CDTec)

Prof. Dr^a. Mariana Härter Remião (UFPel, CDTec)

Prof. Dr^a. Priscila Marques Moura de Leon (UFPel, CDTec)

À minha família,

Dedico.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, pelo dom da vida e por todas minhas conquistas e sonhos realizados, dificuldades vencidas e metas alcançadas.

Aos meus pais, Mario Thadeo e Maria Elvira por não terem poupados esforços para que eu pudesse ter uma educação de qualidade sem nunca deixarem que me faltasse nada em momento algum.

As minhas irmãs, Ana Laura e Ana Carolina e ao meu cunhado Rodrigo por sempre me ajudarem nos momentos em que precisei, muitas vezes fazendo papéis de pais quando necessário para que eu nunca deixasse de trilhar os caminhos certos.

A minha namorada Helena por todo amor, dedicação e paciência que teve comigo durante esse período, muitas vezes estressante.

Aos amigos que fiz durante a graduação e que acabaram se tornando grandes amigos, os quais me acompanharam nesse caminho do mestrado, muitas vezes árduo e cansativo.

Ao grupo GPO, em especial aos meus orientadores, Prof. Tiago Collares e Profa. Fabiana Seixas e colegas de laboratório que sempre me deram o suporte necessário para que eu pudesse executar meus experimentos. Também agradeço muito ao doutorando William Domingues, Prof. Antonio Sergio Varela Junior e a Profa. Carine Corcini pessoas fundamentais para que meu projeto pudesse ser executado com êxito.

Aos grupos parceiros da Profa. Silvia Guterres e Profa. Adriana Pohlmann pelo fornecimento dos nanocompostos utilizados nos experimentos.

Aos meus amigos, os “Brothers” que sempre estiveram do meu lado, tanto na hora de fazer festa e aproveitar, quanto na hora de me aconselhar a baixar a cabeça e trabalhar para alcançar meus objetivos.

A agência de fomento CNPq, pela bolsa de Mestrado concedida. Também à Universidade Federal de Pelotas (UFPel), por toda a infraestrutura oferecida para as aulas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e realização dos experimentos. E aos professores do PPGB, pelos ensinamentos e amizade.

Meu muito obrigado.

“Qualidade significa fazer certo quando ninguém está olhando”

Henry Ford

Resumo

Cruzeiro, Pedro Sica. **Nanoresveratrol diminuiu EROs e LPO e aumenta motilidade progressiva em espermatozoides bovinos descongelados**. 2019. 38f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A criopreservação de sêmen vem sendo cada vez mais utilizada tanto para estudos científicos quanto aplicação prática. Este sistema apresenta algumas problemáticas as quais busca-se uma melhor compreensão e resolução de maneira prática, isto pode se dar com a utilização de compostos os quais podem driblar e combater possíveis mecanismos danosos às células. O resveratrol é um composto polifenólico com atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, ainda assim, o seu consumo ajuda na prevenção de doenças cardíacas, diabetes e obesidade. Visando uma melhor entrega e melhor absorção, o resveratrol foi nanoencapsulado e testado em células espermáticas criopreservadas, tanto em sua forma nano (LNC-Res) como em sua forma livre (Res), nas concentrações de 5, 25, 50, 100, 200 e 400 μ M. Após descongelamento, os espermatozoides foram incubados por 15 e 60 minutos, posteriormente sendo analisados seus parâmetros como: de integridade de membrana, fragmentação de DNA, reação acrossomal, funcionalidade de mitocôndria, espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica (LPO). As análises foram realizadas em citometria de fluxo e análises cinéticas no sistema CASA, onde foram observadas as motilidades total e progressiva. Assim sendo, os resultados obtidos demonstraram que nas análises de integridade de membrana, após 60 min houve uma redução nos níveis de membranas intactas nas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 μ M. Na análise de fragmentação de DNA não foi detectado nenhuma diferença estatística em relação ao controle, o que vai ao encontro com os resultados obtidos na análise de LPO e ROS onde ambas demonstraram uma diminuição em 15 min e nas análises de ROS uma diferença estatística entre todos tratamentos e o controle. Já a funcionalidade das mitocôndrias observou-se diferença estatística entre LNC-Res nas concentrações de 50 e 100 μ M quando comparada com 400 μ M de Res após 60 minutos. Com estes resultados, pode se constatar que o resveratrol não induziu toxicidade às células espermáticas bovinas e foi observado que este composto em sua forma

nanoencapsulada estimulou a maquinaria antioxidante intracelular gerando uma proteção para a elas. Neste sentido, o LNC-Res pode vir a se tornar uma promissora forma farmacêutica para o fármaco em questão.

Palavras-chave: antioxidante, células espermáticas, citometria de fluxo, nanotecnologia, resveratrol.

Abstract

CRUZEIRO, Pedro. **Nanoresveratrol decreased ROS and LPO and increased progressive motility in thawed bovine spermatozoa.** 2019. 38f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Semen cryopreservation has been increasingly used for both scientific studies and practical application. This system presents some problems which seek a better understanding and resolution in a practical way, this can be with the use of compounds which can dribble and combat possible damaging mechanisms to the cells. Resveratrol is a polyphenolic compound with antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activity, yet its consumption helps prevent heart disease, diabetes and obesity. In order to improve delivery and better absorption, resveratrol was nanoencapsulated and tested in cryopreserved sperm cells, both in its nano form (LNC-Res) and its free form (Res), at concentrations of 5, 25, 50, 100, 200 and 400 μ M. After thawing, spermatozoa were incubated for 15 and 60 minutes, after which their parameters were analyzed: membrane integrity, DNA fragmentation, acrosomal reaction, mitochondrial functionality, reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (LPO). The analyzes were performed in flow cytometry and kinetic analyzes in the CASA system, where the total and progressive motilities were observed. Therefore, the results showed that in the membrane integrity analyzes, after 60 min there was a reduction in the intact membrane levels at the concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 μ M. In the analysis of DNA fragmentation no statistical difference was detected in relation to the control, which is in agreement with the results obtained in the analysis of OLP and ROS where both showed a decrease in 15 min and in the analysis of ROS a statistical difference between all treatments and control. The functionality of the mitochondria observed a statistical difference between LNC-Res in concentrations of 50 and 100 μ M when compared with 400 μ M of Res after 60 minutes. With these results, it can be seen that resveratrol did not induce toxicity to bovine sperm cells and it was observed that this compound in its nanoencapsulated form stimulated the intracellular antioxidant machinery generating a protection for them. In this sense, LNC-Res may become a promising pharmaceutical form for the drug in question.

Keywords: antioxidant, flow citometry, nanotechnology, resveratrol, sperm cells.

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura química dos isômeros de Resveratrol	20
Figura 2. Estrutura do espermatozoide.....	25

Lista de Símbolos e Abreviaturas

ATP – Adenosina trifosfato

Ca²⁺ –Íon de Cálcio

CASA - *Computer Assisted Spem Analysis* (Sistema automatizado para análise de sêmen)

DNA – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

IL-1 – Interleucina 1

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

LNC – *Lipid-core nanocapsules* (Nanocapsulas de núcleo lipídico)

LNC-CS – *Chitosan-coated lipid-core nanocapsules* (Nanocapsulas de núcleo lipídico revestidas de quitosana)

LPO – *Lipid peroxidation* (Peroxidação lipídica)

NAD - *Nicotinamide adenine dinucleotide* (Dinucleótido de nicotinamida e adenina)

NNI – *National Nanotechnology Initiative*

NO – *Nitric oxid* (Óxido nítrico)

PolyQ – *Polyglutamine* (Poliglutamina)

Res - Resveratrol

ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

SIRT1 – Sirtuína 1

TNF α – *Tumoral necrose fator α* (Fator de necrose tumoral alfa)

UV – Ultravioleta

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO GERAL.....	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1.	Criopreservação de sêmen	18
2.2.	Resveratrol	19
2.3.	Nanotecnologia e sua importância na área médica	21
2.4.	Citometria de Fluxo para análise espermática	24
2.4.1.	Parâmetros de análise.....	24
3.	HIPÓTESE E OBJETIVOS	28
3.1.	Hipótese	28
3.2.	Objetivo Geral.....	28
3.3.	Objetivos Específicos	28
4.	CAPÍTULO 1	29
4.1.	Manuscrito 1 - Nanoresveratrol protects and stimulates sperm cell machinery. 29	
5.	CONCLUSÃO	51
6.	REFERÊNCIAS.....	52

1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de sêmen criopreservado está em constante estudo em busca de melhores taxas de motilidade após o descongelamento. O desenvolvimento de produtos para melhoramento deste descongelamento faz-se necessário, podendo com a utilização de diversos compostos com inúmeras funções chegar a um resultado satisfatório. Um grande desafio no uso de sêmen criopreservado são os radicais livres, os quais podem gerar danos às células influenciando diretamente na sua morfologia e motilidade (Grotter et al., 2019).

Com isso, o estudo de compostos antioxidantes é de suma importância resolução desta questão (Aitken et al., 2012). O Resveratrol (Res), é um composto antioxidante, polifenólico natural produzido por uma enorme gama de plantas (Neves et al., 2012). Pode ser encontrado de maneira abundante nas uvas, mais precisamente em sua casca, fazendo com que o vinho tinto seja uma das maiores fontes deste composto, o qual também pode ser encontrado em diversos alimentos como: amendoim, mirtilo e seus derivados (Goswami et al., 2009). O composto em questão, apresenta duas formas isoméricas, cis e trans, sendo a segunda amplamente utilizada na indústria farmacêutica e de maior abundância na natureza. No entanto, o trans-resveratrol apresenta capacidade fotossensível, ou seja, quando exposto a luz solar, branca ou luz ultravioleta (UV) de 360nm, ocorre a isomerização para cis-resveratrol (Montsko et al., 2008). O trans-resveratrol, composto de interesse, demonstra inúmeras atividades farmacológicas, tais como: anti-inflamatório, antioxidante e antitumorais (Albuquerque et al., 2015; Signorelli & Ghidori, 2005; Mahal & Mukherjee, 2006). Dentre estes efeitos, a atividade antioxidante torna-se muito importante pois ajuda na proteção contra estresse oxidativo em uma grande variedade de tecidos, fazendo com que colabore com condições patológicas como doenças cardiovasculares, câncer e diabetes (Kuhad et al., 2008).

O trans-resveratrol, vem sendo estudado tanto em sua forma livre e também mais recentemente em sua forma nanoencapsulada (Figueiró et al., 2013). Compostos nanoencapsulados apresentam algumas vantagens significativas sobre os mesmo em sua forma livre. Uma das principais

vantagens em relação a nanotecnologia, é que os compostos em nanoencapsulados apresentam uma proteção maior contra degradação e possíveis alterações dos seus grupos funcionais, também esta tecnologia está diretamente relacionada com a entrega do produto para os locais corretos na célula de interesse para sua posterior liberação (Coradini et al., 2015). É de suma importância frisar que compostos quando nanoencapsulados tem uma melhora na sua biodisponibilidade, com isso é possível se afirmar que estes nessa forma conferem a possibilidade de minimização de feitos deletérios as células onde atuam (Cambrussi et al., 2018; Huang, Yu & Ru, 2010).

Em estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa pode ser observado com a adição de LNCs associadas a diferentes compostos durante a maturação *in vitro* de oócitos e cultivo de embriões *in vitro* um aumento na clivagem dos embriões, produção de blastocistos (Lucas et al., 2015; Remião et al., 2016) e taxa de eclosão (Kominou et al., 2016). Mais recentemente, em outro estudo também realizado por nosso grupo de pesquisa, Silva e colaboradores (2017) realizaram testes de toxicidade de diferentes concentrações de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) e também de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas por quitosana (LNC-CS) usando espermatozoides da espécie bovina. Como resultado não foi observado toxicidade nas células espermáticas diante da LNC quando utilizadas abaixo 40% (v/v) de concentração.

Desta forma, o englobamento do composto resveratrol no interior da LNC, pode ser utilizado no combate a espécies reativas de oxigênio (EROS), já que o resveratrol é um potente antioxidante. É sabido que EROS causam danos significativos as células espermáticas fazendo com que percam sua viabilidade após o descongelamento.

Para melhor observação da ação do resveratrol, testes utilizando-o tanto na sua forma livre quanto na sua forma nanoencapsulado foram realizados, utilizando concentrações de 5, 25, 50, 100, 200 e 400µM em ambas as formas de apresentação sendo realizadas as análises após 15 e 60 minutos de incubação.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Criopreservação de sêmen

A criopreservação de sêmen de mamíferos é uma técnica que vem sendo desenvolvida a muito tempo, tendo importantes constatações no seu entorno que fazem com que se torne vastamente utilizada para criação de animais. Dentre as diversas razões pelas quais esta técnica apresenta grande importância pode-se citar que: coopera na manutenção da diversidade genética tanto de animais domésticos quanto de animais silvestres; demonstra importante papel no tratamento de infertilidade; desenvolvimento de bancos de modelos animais geneticamente modificados (Critser & Russell, 2000).

Polge e seus colaboradores em 1949 fizeram uma descoberta fundamental para o desenvolvimento desta técnica, observaram que o glicerol, um soluto permeável, poderia fornecer proteção às células em baixas temperaturas. Com isso, nos decorrentes anos foram observadas pesquisas em torno da melhora no desenvolvimento de técnicas de congelamento de sêmen para utilização em inseminação artificial (IA). Para tais avanços, se busca sempre melhorar os diluentes para que este congelamento seja bem sucedido.

Crioprotetores são importantes, podendo ser citados: açúcares, como falado anteriormente o glicerol; proteínas e polímeros sintéticos como agentes extracelulares ajudando a célula se desidratar e assim não formar cristais de gelo no meio intracelular (Celeghini et al., 2008). Aditivos também ajudam no controle de alguns fatores sendo importante frizar neste caso os antioxidantes, os quais ajudam no controle da formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) os quais podem ser observados em análises pós-descongelamento (Medeiros et al., 2002).

Bratton et al. (1955), em testes de campo fizeram a demonstração que o o esperma bovino congelado a -79°C com utilização de gelo seco era capaz de produzir alta fertilidade após a IA. Desde então, tem se estudado o melhoramento dos diluentes para descongelamento, sempre buscando melhores taxas de sobrevivência e motilidade pós-descongelamento para quando utilizado, este sêmen contenha espermatozoides viáveis para uma IA rentosa em questão de concepção (Holt, 2000). Ainda nos anos 50, foi descoberto que o armazenamento à temperatura de -196°C em nitrogênio líquido se demonstrava melhor que o mesmo

realizado a -79°C já que assim acabava ocorrendo alterações em suas propriedades biológicas (Lonergan, 2018).

Com o decorrer dos anos, técnicas em torno da criopreservação foram evoluindo e se demonstrando capazes de melhorar a criação e produção de diversas espécies de animais. Técnicas como IA e sexagem de sêmen são amplamente estudadas a décadas e com isso pode-se chegar a grandes resultados. Desta forma, pode-se dizer que a criopreservação do sêmen é a técnica mais utilizada na pecuária atualmente, cooperando diretamente na manutenção de genéticas raras, mas também no melhoramento genético fazendo com que seja possível a disseminação de genéticas de touros testadas (Grotter et al., 2019). Apesar de todos avanços, ainda há muito o que ser estudado em torno do melhoramento do sêmen na sua forma criopreservada.

2.2. Resveratrol

O resveratrol (3,4',5-tri-hidroxiestilbeno) é um composto polifenólico natural produzido por uma grande variedade de plantas, tais como: uvas, amendoim, mirtilo (Arora and Jaglan, 2017; Goswami and Das, 2009). Ele é classificado como uma fitoalexina natural, sendo substâncias sintetizados *de novo* como uma maneira de defesa das plantas principalmente após invasão ou contato agressores externos (Braga & Dietrich, 1987). Este composto apresenta isômeros trans e cis (Figura 1), sendo o trans-resveratrol o qual é a forma mais abundante e biologicamente ativa (Stervbo et al., 2007). Esta forma trans possui muitos benefícios para a saúde dentre os quais podemos citar: atividade antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora e antitumoral (Kumar and Surh, 2008). Quando utilizado deve-se ter cautela na sua manipulação pois é extremamente fotossensível, uma vez exposto a luz UV pode sofrer isomerização para cis-resveratrol (Vian et al., 2005).

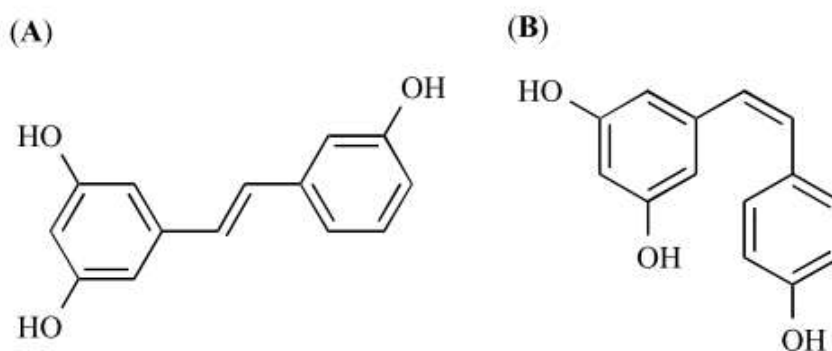


Figura 1: Estrutura química dos isômeros do Resveratrol. (A) trans-Resveratrol (B) cis-Resveratrol.

Foi isolado pela primeira vez por volta dos anos 1939 das raízes de *Veratrum grandiflorum*, mais conhecido como heléboro branco, posteriormente também extraída de *Polygonum cuspidatum* (Takaoka, 1940; Nonomura et al., 1963). Alguns anos depois, foi constatado após estudos epidemiológicos uma relação entre o vinho tinto e a baixa incidência de doenças cardiovasculares, fenômeno chamado então de “Paradoxo Francês” (Richard, 1987; Fauconneau et al., 1997). Este nome foi dado, pois este estudo foi realizado em uma região da França em que a população, apesar da dieta era rica em gorduras e do sedentarismo apresentava aproximadamente 40% menos incidência de doenças cardiovasculares como infartos em relação ao resto da Europa (Neves et al., 2012; Renaud and de Lorgeril, 1992). Um hábito observado foi o alto consumo de vinho tinto, portanto, alto consumo de resveratrol. A presença de resveratrol no vinho foi bem sinalizada por Siemann & Creasy em 1992, porém somente em 1997 houve destaque a este composto quando Jang e colaboradores reconheceram suas propriedades anticarcinogênicas.

Com o passar dos anos, o resveratrol chamou atenção por suas diversas atividades biológicas e farmacológicas as quais vem sendo demonstradas, dentre elas: antioxidante (Albuquerque et al., 2015; Fauconneau et al., 1997), anti-inflamatória (Lastra and Villegas, 2007), neuroprotetora (Bastianetto et al., 2000), cardioprotetora (Bradamante et al., 2004) e posteriormente, foi descoberto um potencial para tratamento de diabetes (Szkudelska and Szkudelski, 2010).

Como função primordial do resveratrol para o uso com células espermáticas, sua função antioxidante torna ele um ótimo eliminador de radicais livres como hidroxilas, superóxidos, tanto enzimático como celular. Este composto

apresenta um efeito o qual protege a célula contra peroxidação lipídica na sua membrana celular, dessa forma faz uma proteção também a danos ao DNA causados por espécies reativas de oxigênio (EROS). EROS e os radicais livres estão diretamente ligados com algumas doenças e vias de respostas celulares. O organismo gera antioxidantes para defesa endógena como, catalase, superóxido desmutase (SOD) e ácido úrico, porém antioxidantes exógenos vêm sendo utilizados para que a célula possa ter defesa externa também. O Resveratrol é muito pesquisado para esta função, pois como citado anteriormente ele é de fácil obtenção uma vez que é encontrado em diversos alimentos (Leonard et al., 2003).

2.3. Nanotecnologia e sua importância na área médica

Em 1959, Richard Feynman introduziu em uma palestra o conceito nanotecnologia, tratando como um campo muito importante para realização de pesquisas científicas no futuro. (Safari and Zarnegar, 2014).

A nanotecnologia vem complementando estudos realizados em torno de diversos fármacos e compostos, com ela, a ciência vem conseguindo fazer com que a manipulação de partículas extremamente pequenas como átomos e moléculas sejam realizadas com sucesso. As nanoestruturas apresentam pelo menos dimensões de 1 a 1000 nanômetros (Hnawate, 2017; Wilkinson, 2003). Todo sistema biológico e de alguma maneira artificial tem seu nível inicial organizado em nanoescala. Ilustrando a importância já destacada desde seus primórdios, nos anos 2000 foi criado a “National Nanotechnology Initiative (NNI)” nos Estados Unidos, pouco tempo depois Europa e Japão e mais 35 países criaram programas semelhantes como uma estratégia para desenvolvimento da área (Roco, 2003).

Pesquisas em torno da nanotecnologia se exibem de modo interdisciplinar, podendo apresentar avanços nas áreas de engenharia, química, física, biologia, medicina, dentre outras. Na área médica, a nanotecnologia vem apresentando um impressionante desenvolvimento para melhoramento de doenças através da entrega de medicamentos direcionada, provando que esta inovadora tecnologia vem para somar ao mundo da ciência (Sahoo and Labhasetwar, 2003). O objetivo desse tipo de entrega é o melhor direcionamento e transporte de quantidades

adequadas de medicamento para o local desejado, para que se possa obter menores efeitos colaterais nos demais tecidos (Seaton et al., 2010).

No decorrer dos anos, nanomateriais, dispositivos orgânicos e inorgânicos estão sendo testados como veículos de entrega de compostos com intuito de um desenvolvimento maior na biodisponibilidade e farmacocinética dos medicamentos. Para que isso pudesse acontecer, uma proteína da droga a qual se almeja este progresso deve combinar com uma nanopartícula de polímero ou nanoestrutura química. Podemos ter como exemplos lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanocapsulas, nanotubos, nanogeis, polímeros terapêuticos e outros, todos sendo considerados em uma classificação de distribuição de medicamento baseada na nanomedicina (Goldberg et al., 2007; Wagner et al., 2006). Existem diversos outros métodos pelos quais da nanotecnologia vem sendo utilizada, como por exemplo: melhor distribuição de medicamentos poucos solúveis em água (drogas hidrofóbicas), entrega direcionada de droga para dada célula ou tecido, co-entrega de dois ou mais fármacos em uma formação nano tendo como objetivo uma terapia combinada (Farokhzad and Langer, 2009; Liong et al., 2008).

Muitas áreas paralelas à biotecnologia já apresentam avançados experimentos em torno da nanotecnologia. A nanoembriologia é uma área que vem em busca de aumento nos rendimentos para melhoramento da maturação *in vitro* de oócitos e cultivo *in vitro* de embriões, tendo então como uma alternativa ao melhoramento na entrega de nanocompostos para aumento de clivagem de embriões, produção de blastocistos (Lucas et al., 2015; Remião et al., 2016) e taxas de eclosão (Kominou et al., 2016).

No combate ao câncer, nanotecnologia vem aparecendo como uma alternativa para ajudar no conforto de pacientes que passam por tratamentos com quimioterapia, já é descrito na literatura de maneira bem vasta plataformas nanométricas para melhorar a entrega dessas drogas, minimizando efeitos colaterais e aumentando a eficácia da droga na célula ou tecido desejado (Pushpalatha et al., 2017).

2.4.1.1. Plataformas nanométricas de entrega de drogas quimioterápicas

Atualmente existe uma gama muito grande de plataformas em escala nanométrica sendo testadas e algumas já utilizadas para o intuito de entregar os agentes quimioterápicos da melhor maneira possível, podendo utilizar até dois fármacos ao mesmo tempo. Podemos citar alguns desses instrumentos que estudos na área na nanotecnologia vem colocando à disposição no decorrer dos anos, sendo alguns deles: (A) Lipossomas, estruturas esféricas com tamanho variável de 20nm a micrometro com núcleo aquoso e vesícula em seu invólucro. Apresentam em sua estrutura uma membrana de camada única ou múltipla contendo lipídeos naturais ou sintéticos e colesterol para obtenção da textura adequada. Tem como vantagem sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e utilização tanto em drogas hidrofóbicas como hidrofílicas (Al-Jamal & Kostarelos, 2011). (B) Dendrímeros, são macromoléculas altamente ramificadas, em sua estrutura contém um núcleo iniciador, camadas de ramificações e grupos terminais funcionais na camada mais externa. Este sistema é de grande favorecimento para entrega de drogas tanto solúveis em água quanto insolúveis em uma única plataforma (Tekade et al., 2009). (C) Micelas poliméricas, nanopartículas esféricas feitas em meio aquoso em blocos hidrofóbicos e hidrofílicos (Cho et al., 2015), este tipo de nanopartícula pode ter seu tamanho diminuído para ter maior facilidade de acúmulo em tecidos tumorais. Seu uso apresenta um desafio referente a sua estabilidade quando em contato com fluidos corpóreos (Makino et al., 2014; Rao et al., 2015). (D) Nanocapsulas são sistemas coloidais poliméricos, apresentam atividade biodegradável e estas estruturas apresentam estrutura vesicular com capacidade de melhoramento de propriedades farmacêuticas. Este sistema pode apresentar diferentes tipos de núcleos, sendo o mais comum o oleoso, o lipídico mais recentemente estudado que pode gerar uma melhor biodisponibilidade de alguns fármacos (Frozza et al., 2010; Müller et al., 2000). (E) Nanocarreadores inorgânicos, carreadores baseados em metais inorgânicos os quais apresentam maior área de superfície em comparação a transportadores orgânicos, podendo então proporcionar transporte de maior quantidade de carga de fármacos. Dentre estes, podemos denominar, óxidos de ouro, prata, óxido de metais como zinco, alumínio, silício, para tais, são encontradas diversas funções com relação a diagnóstico por imagem, terapias fotodinâmicas e radioterapia, sendo menos aplicados para entrega de drogas (Chen et al., 2014; Ojea-Jimenez et al., 2013).

2.4. Citometria de Fluxo para análise espermática

Citometria de fluxo é uma técnica que com passar dos anos foi substituindo as técnicas demoradas e mais propensas a erros, como análises por microscopia com utilização de sondas fluorescentes. Este sistema une diferentes testes para alcançar um resultado mais fidedigno (Martínez-Pastor et al., 2011).

Esta técnica é capaz de analisar milhares de células em segundos, fazendo uma leitura detalhada de cada uma delas e demonstrando uma repetibilidade dificilmente alcançada por outra semelhante. Em uma análise utilizando citômetro de fluxo, espermatozoides são marcados com fluoróforos, passam pelo sistema que analisa utilizando luzes, espelhos e filtros e estas então os dados são digitalizados e apresentam as diferentes intensidades de fluorescência gerando resultados (Lo et al., 2008).

O citômetro de fluxo é um equipamento que vem sendo utilizado não apenas para pesquisa em torno da fisiologia do espermatozoide de maneira precisa, mesmo este sendo um ponto chave importante de ser entendido para os que desejam utilizar este equipamento, mas também para melhoramento de diagnósticos em torno de problemas de fertilidade relacionados a este tipo de célula (Gillan et al., 2005).

2.4.1. Parâmetros de análise

Para melhor entendimento dos parâmetros analisados pela citometria de fluxo é necessário se entender a morfologia dos espermatozoides (Figura 2). Esta morfologia é bem definida e semelhante nas diferentes espécies. As células se apresentam de maneira alongada, com uma cabeça, peça intermediária e cauda. A cabeça é recoberta de um capuz acrossomal, esta estrutura é responsável pela reação acrossômica a qual faz a conexão entre o oócito e espermatozoide. Também nesta porção está localizado o núcleo contendo seu DNA que será passado para as próximas gerações através da fecundação com o gameta feminino. Na peça intermediária encontram-se as mitocôndrias, responsáveis pelo fornecimento de energia dos espermatozoides, influenciando diretamente a motilidade dessas células, pois o movimento flagelar é realizado por meio dessa

energia gerada. O flagelo ou cauda é a última porção, responsável pelo deslocamento, defeitos nessa estrutura inviabilizam a fertilização natural (OpenStax, 2016).

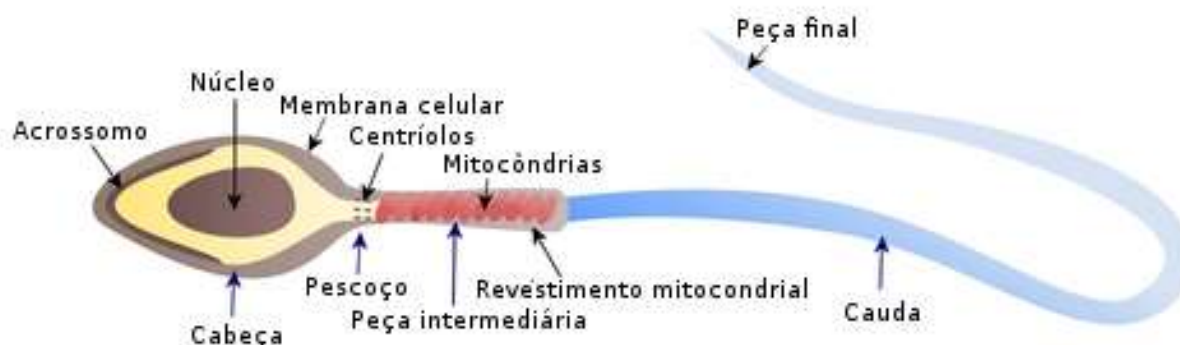


Figura 2: Estrutura do espermatozoide.

Fonte: Zuzanae / Shutterstock.com

2.4.1.1. Integridade de Membrana

A membrana plasmática de células espermáticas é constituída basicamente por uma bicamada lipídica com proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas de superfície e glicolípídeos organizados em mosaico fluido (Eddy & O'Brien, 1994). Esta membrana apresenta função de extrema importância na fertilização tais como: interações com proteínas de membrana de células epiteliais do oviduto e participação na capacitação espermática (Jansen et al., 2001). Remodelações podem ser sofridas pela membrana plasmática dos espermatozoides quando ocorre a interação proteica do mesmo com o plasma seminal durante a ejaculação (Manaskova et al., 2003).

Problemas muito recorrentes em relação a esta porção ocorre quando ele é criopreservado, podendo ocorrer ruptura desta fazendo com que a célula perca sua capacidade de fecundação com uma reação acrossômica prematura (HARRISON, 1997) uma vez que a membrana espermática é extremamente suscetível a crioinjúrias (Peña, 2003).

2.4.1.2. Fragmentação de DNA

O DNA espermático é formado a partir de unidades de desoxirribonucleotídeos ligadas covalentemente. Ele serve como o armazenamento de informações hereditárias dentro de uma célula, é caracterizado por ser transportador dessas informações de geração para geração. Se encontra no interior do núcleo de maneira extremamente compactada de modo com que seu volume seja minimizado e a sua transcrição é interrompida. Esse mecanismo é importante para o transporte (Alberts et al., 2002). A análise de fragmentação de DNA espermática responde sobre a capacidade do espermatozoide passar as informações necessárias para sua geração da prole. Quando há a fragmentação de DNA é necessário observar qual a causa, para isso recomenda-se o uso de outras análises, tais como integridade de membrana, de acrossoma e peroxidação lipídica (Lastra and Villegas, 2007).

2.4.1.3. Funcionalidade de mitocôndria

Como todos outros componentes do espermatozoide, a mitocôndria desempenha um papel essencial a de geração de energia para a célula na produção de adenosina trifosfato (ATP) através de um sofisticado mecanismo de fosforilação oxidativa (Ferramosca et al., 2017). Este ATP é utilizado em união com proteínas motoras de dineína as quais utilizam sua hidrólise para geração de movimento flagelar (Alberts et al., 2002). Além de sintetizar ATP as mitocôndrias são fontes importantes de espécies reativas de oxigênio (EROs) as quais são mediadores na fisiologia celular (Ferramosca and Zara, 2014). Quando a mitocôndria apresenta baixo ou inativo funcionamento, desencadeia uma falta de movimento flagelar, diminuição na respiração celular fazendo com que a célula perca sua motilidade, desta maneira deixando de cumprir seu papel fundamental (Ferramosca et al., 2012).

2.4.1.4. Espécies reativas de oxigênio (EROS)

As espécies reativas de oxigênio (EROS) desempenham um importante papel na fisiologia dos espermatozoides ajudando a minimizar danos às membranas, todavia podem ser prejudiciais a sua fertilização. Desta maneira, é de suma importância que seja feita sua detecção e avaliação tanto para estudos

fisiológicos quanto patológicos. A detecção de ROS e outras espécies oxidativas pode ser realizada com utilização de citometria de fluxo, onde ocorre acúmulo de reagentes no interior da célula fazendo com que ocorra a marcação fluorescente após a oxidação (Martínez-Pastor et al., 2010). O ataque oxidativo as membranas das células resultam em uma peroxidação lipídica afetando dessa forma de maneira negativa. O funcionamento dos espermatozoides, pois como dito anteriormente o LPO apresenta uma correlação direta com o DNA da célula, desta maneira causando danos irreversíveis (Brouwers & Gadella 2003).

2.4.1.5. Peroxidação lipídica (LPO)

A membrana plasmática é responsável por capacidades funcionais dos espermatozoides, seus lipídeos são os principais substratos para que haja a peroxidação. A peroxidação lipídica pode levar as células a apresentarem grandes distúrbios. Uma das razões pela qual há aumento de LPO em células espermáticas é o estresse oxidativo (Sanocka and Kurpysz, 2004). Essa condução pode ser muito danosa aos espermatozoides pois os lipídeos da membrana destes gametas têm papel de extrema importância na capacitação: quando há uma peroxidação desses lipídeos de maneira excessiva, pode haver um descontrole nos níveis de EROS, fazendo com que ocorra alguma disfunção de maneira irreversível nas células. Um método que pode ajudar nesse controle, é a utilização de antioxidantes para que regulem a quantidade de radicais livres na membrana para que a célula cumpra seu papel de maneira correta (de Lamirande and Gagnon, 1995).

3. HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1. Hipótese

Nanocápsulas de núcleo lipídico contendo resveratrol protegem os espermatozoides de danos oxidativos após o descongelamento.

3.2. Objetivo Geral

Avaliar o efeito de nanocápsula de núcleo lipídico contendo resveratrol, frente à espermatozoides bovinos descongelados.

3.3. Objetivos Específicos

- Validar de teste de toxicidade utilizando sêmen bovino criopreservado;
- Medir os parâmetros cinético utilizando o sistema casa em espermatozoides bovinos criopreservados;
- Utilizar citometria de fluxo para medição de parâmetros espermáticos como:
 - Integridade de membrana
 - Fragmentação de DNA
 - Funcionalidade de mitocôndria
 - Peroxidação lipídica (LPO)
 - Concentração de espécies reativas de oxigênio (ROS)

4. CAPÍTULO 1

4.1. Manuscrito 1 - Nanoresveratrol protects and stimulates sperm cell machinery.

(Manuscrito conforme normas do jornal *Frontiers Pharmacology*)

Title: Nanoresveratrol decreased ROS and LPO and increased progressive motility
in thawed bovine spermatozoa.

CRUZEIRO, P. S.

^aLaboratório de Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico,
Biotecnologia, UFPel, Pelotas, RS 96010-900, Brazil

^bLaboratório de Reprodução Animal (ReproPel), Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS 96010900, Brazil

^cFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga,
2752, Porto Alegre 90610-000, RS, Brazil

Abstract

Semen cryopreservation has been increasingly used for both scientific studies and practical application. This system presents some problems which seek a better understanding and resolution in a practical way, this can be with the use of compounds which can dribble and combat possible damaging mechanisms to the cells. Resveratrol is a polyphenolic compound with antioxidant, anti-inflammatory and anti-tumor activity, yet its consumption helps prevent heart disease, diabetes and obesity. In order to improve delivery and better absorption, resveratrol was nanoencapsulated and tested in cryopreserved sperm cells, both in its nano form (LNC-Res) and its free form (Res), at concentrations of 5, 25, 50, 100, 200 and 400 μ M. After thawing, spermatozoa were incubated for 15 and 60 minutes, after which their parameters were analyzed: membrane integrity, DNA fragmentation, acrosomal reaction, mitochondrial functionality, reactive oxygen species (ROS) and lipid peroxidation (LPO). The analyzes were performed in flow cytometry and kinetic analyzes in the CASA system, where the total and progressive motilities were observed. Therefore, the results showed that in the membrane integrity analyzes, after 60 min there was a reduction in the intact membrane levels at the concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 μ M. In the analysis of DNA fragmentation, no statistical difference was detected in relation to the control, which is in agreement with the results obtained in the LPO and ROS analysis, where both showed a decrease in 15 min and in the analyzes of ROS a statistical difference between all the treatments and control. The functionality of the mitochondria observed a statistical difference between LNC-Res in concentrations of 50 and 100 μ M when compared with 400 μ M of Res after 60 minutes. Finally, it was noted that in the acrosomal reaction analyzes, there was an increase in the concentrations of 100, 200 and 400 μ M in both LNC-Res and Res in the first 15 min, in 60 min only the concentrations of 200 and 400 μ M of LNC-Res showed an alteration. With these results, it can be seen that resveratrol did not induce toxicity to bovine sperm cells and it was observed that this compound in its nanoencapsulated form stimulated the intracellular antioxidant machinery generating a protection for them. It may prove to be a promising pharmaceutical form for the drug in question.

Keywords: Antioxidant, flow citometry, Nanotechnology, Resveratrol, Sperm cells.

1. Introduction

The use of cryopreserved semen is under constant study in search of better motility rates after thawing. The development of products to improve this thawing is necessary, and with the use of several compounds with numerous functions, a satisfactory result can be achieved. A great challenge in the use of cryopreserved semen is the free radicals, which can generate damages to the cells directly influencing its morphology and motility (1).

With this, the study of antioxidant compounds is of utmost importance resolution of this issue (2). Resveratrol (Res) is a polyphenolic antioxidant compound (3) present abundantly in different food like grapes, peanuts and blueberries (4). In grapes it is predominantly found in its bark, making red wine the largest source of this compound (3). This compound present two isomeric forms, *cis* and *trans*, being the second form widely used in the pharmaceutical industry and found more easily in nature. However, *trans*-resveratrol has a photosensitive characteristic: when exposed to solar, white or 360 nm ultraviolet (UV) light, the *cis*-isomerisation can occur (6,7). The *trans*-resveratrol, has several pharmacological properties, like antioxidant (8,9) and anti-inflammatory activity (8). Due to its protective effect against oxidative stress, it has been described to be used in treatments of pathological conditions such as cardiovascular diseases, inflammatory responses, cancer, obesity and diabetes (11,12).

This compound has been explored both in its free form and more recently in nanocapsules (13–15). Nanoencapsulation brings many benefits compounds: increasing of aqueous solubility, greater protection of the compound against the degradation and changes in their functional groups, and controlled release for the target tissue(16). It is important to emphasize that nanoencapsulated compounds confer the possibility of minimizing deleterious effects on cells by modifying their bioavailability (17).

In studies conducted previously by our research group can be observed with the addition of LNCs associated with different compounds during the in vitro maturation of oocytes and embryo culture in vitro an increase in embryo cleavage, production of blastocysts(18,19) and hatching rate(20). More recently, in another study conducted by our research group, Silva et al. (21) performed a series of toxicity tests of different concentrations of lipid core nanocapsules (LNC) and chitosan-coated lipid core nanocapsules (LNC-CS) using bovine spermatozoa, measuring the kinetic parameters, membrane and acrosomal integrity, lipid peroxidation and genomic DNA damage. The results of this study showed that there is no toxicity from LNCs and LNC-CS below 40% (v/v) concentration. Seeking to associate the possible beneficial effects of resveratrol with the properties conferred by lipid core nanocapsules, the present study was conducted to determine the effect of different concentrations of nanoencapsulated resveratrol (LNC-Res) on sperm kinetics and motility parameters, viability, plasma membrane and acrosome integrity, LPO, production of reactive oxygen species (ROS), as well as genomic DNA fragmentation in post-thaw bull semen.

2. Materials and Methods

2.1.1. Synthesis and avaluation of LNC

The synthesis of trans-resveratrol-loaded lipid-core nanocapsules dispersed in water was performed by the self-assembling method. Trans-resveratrol (0.010 g), caprolactone (0.100 g), capric / caprylic triglycerides (0.165 ml) and sorbitan monostearate (0.0385 g) were dissolved at 40°C in acetone (24 mL) and ethanol (3 mL). Under magnetic stirring and controlled temperature, the organic phase was injected into the aqueous phase of 53 mL containing polysorbate 80 (0.0770 g). After 10 min, the evaporation of the organic solvents occurred under reduced pressure at 40 ° C (9 mL). As already known, resveratrol is very sensitive to light, so it is necessary that this production be made in amber bottle protected from light.

2.1.2. Physicochemical Characterization of the Formulations

Using a potentiometer DM-22 (Digimed, Brazil), the pH values of the suspensions were determined. The Zetas-ZS model ZEN 3600 (Nanoseries, Malvern, UK) was used to measure the mean diameters (z-mean), polydispersity index and zeta potential. To perform the analysis the dilution of samples was made in MilliQ® water or 0.01 mol / L NaCl aqueous solution, respectively. In order to ensure the size of the formulated particles, the suspensions also underwent laser diffraction analysis (Mastersizer® 2000, Malvern Instruments, Malvern, UK), mainly observing if they did not present submicrometric size.

2.1.3. Analytical Procedure

Using high performance liquid chromatography (HPLC) at 305 nm, trans-resveratrol analysis was performed. To determine the content of resveratrol (total concentration, Ct) in the formulation (105 µL), the nanocapsules are dissolved in 10 mL of acetonitrile (Tedia Company Inc., Ohio, USA) and subsequently undergoing filtration using a 0.45 µL (Millipore filter). Employing the Shimadzu® system HPLC model Shimadzu LC-20A system (LC-20AT pump, SPD-M20A photodiode-array (PDA) chromatography analysis was performed along with system controller BM-20A, autosampler SIL-20A (Tokyo, Japan) and a Phenomenex RP-Gemini C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm) with a guard-column. The mobile phase, a was used Milli-Q® water and HPLC grade acetonitrile (1:1 v/v) containing 0.5 mg of TBA per milliliter of mobile phase and adjusted to an apparent pH of 3.0 ± 0.5 corrected with 10% (v/v) acetic acid. The calculation of encapsulation efficiency (EE%) made according to Komninou, 2016 (20).

2.2. Semen processing and experimental design

Commercial frozen semen straws from tree bulls were thawed in a water bath at 36 °C for 30 s being suspended in 2 mL DMEM medium (Vitrocell,

Campinas, SP, Brazil). The samples were centrifuged twice for 5 min at 200 ×g to remove cryoprotectants from media. The pellet was resuspended in the same medium and added to the treatments. The treatments used were Res and LNC-Res at the concentrations of 5µM, 25µM, 50µM, 100µM, 200µM and 400µM in both forms of the compound and were then incubated at 36 ° C for the predetermined time for the study, 15 and 60 min for later analysis in the CASA system and in cytometry flow.

2.3. Sperm kinetics analysis

The diluted and incubated samples of the treatments were analyzed using Computer-Assisted Sperm Analysis (AndroVision®, Minitube, Germany). For a reliable evaluation, 10 fields of each slide were observed for recording and observing the spermatic parameters. The following parameters were then analyzed: Total motility (%) and progressive motility (%).

2.4. Cytometry analysis

For the analysis of flow cytometry, we used the Attune® Acoustic Focusing Cytometer (Applied Biosystems). For cellular debris exclusion, except for DNA fragmentation index analyzes, the staining of the cells by Hoechst 33342 at the final concentration of 16.2 µM (Sigma-Aldrich - Saint Louis, MO, USA) was used. We selected 10,000 spermatic events per sample with a flow of 200 cells/s. The results obtained were analyzed using the software Attune Cytometric Software v2.1.

2.4.1. Membrane integrity

For the evaluation of membrane integrity, 20µM carboxyfluorescein diacetate (CFD) was used to generate green fluorescence and 7,3µM propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich – Saint Louis, MO, EUA) red fluorescence. Spermatozoa were classified as non-damaged (CFD+/PI-), damaged (CFD+/PI+; CFD-/PI+; CFD-/PI-) and total membrane analyzed(22,23).

2.4.2. DNA fragmentation analysis

DNA fragmentation index was determined by Sperm Chromatin Condensation Assay (SCCA)(24). For analysis was added 10 μ L of semen already containing the treatment, 5 μ L TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; e pH 7,2) after 30s of incubation, 10 μ L of Triton (Triton X-100 0,1%) (v/v) was added to the sample and finally, after 30s of incubation, 5 μ L of acridine orange (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) was added. This combined probe was then incubated for 5 minutes. The results of these flow cytometric analyzes were expressed as percentage of spermatozoa with DNA fragmentation.

2.4.3. Mitochondrial functionality

For this analysis, 13.0 μ M Rhodamine 123 fluorescence dyes are used which fluoresces in green color and the fluorophore PI in concentration of 7,3 μ M (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) showing red fluorescence. The intact spermatozoa, which did not present red fluorescence (PI -), were selected and classified in high functionality (high fluorescence, high accumulation of Rhodamine 123) and low functionality (low fluorescence, low accumulation of Rhodamine 123) (22).

2.4.4. Lipid peroxidation

To evaluate lipid peroxidation, the spermatozoa after being placed in contact with the treatments were loaded with Bodipy C11 (25) with a final concentration of 1 μ M. This probe after undergoing oxidation, changes its color from red to green. Measurement of the lipid peroxidation rate is performed by the median intensity of green fluorescence.

2.4.5. Concentration of reactive oxygen species (ROS)

For this evaluation, the fluorescent dye 2'7'-dichlorofluorescein diacetate at the final concentration of 1 μ M was used, which emits green fluorescence when oxidized by intracellular ROS and IP at the final concentration of 7.3 μ M. The green fluorescence emitted from live spermatozoa was then observed (IP-) (26).

2.5. Statistical analysis

Differences between experimental groups on CASA derived parameters, membrane integrity, acrosome integrity, concentration of reactive oxygen species, lipid peroxidation, DNA fragmentation index and mitochondrial functionality were analyzed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. All data are reported as means $\pm$ standard error of mean, and P values below 0.05 were considered statistically significant.

3. RESULTS

3.1. LNCs synthesis and characterization

In a macroscopic observation, the nanoencapsulation of LNC-Res resulted in a liquid having a homogeneous white milky coloration. The mean pH presented was 5.7 and the Zeta potential was -13.2 mV. Laser diffraction analysis showed volume-weighted mean diameter, D [4,3], of 156 nm for LNC-Res. The dynamic light scattering analysis showed a mean z-average diameter of 181.2 for LNC-Res. The resveratrol content was 1 mg.ml⁻¹ in the Res-LNC formulation.

3.2. Sperm kinetics

The effects of resveratrol and nanoencapsulated resveratrol on the sperm total and progressive motility are displayed in Table 1.

Resveratrol in its free form at all concentrations tested decreased the sperm total and progressive motility when compared to control (p <0.05) after at 15 minutes and 60 minutes of incubation. After 15 minutes of incubation, the LNC-Res

at concentrations of 100, 200 and 400 μM , did not induced a significant decrease in total motility parameter. In contrast, the LNC-RES at 400 μM was the only experimental group that did not present a increased in progressive motility when compared to the control group. Data showed that the incubation of spermatozoa with both RES and LNC-RES at all concentrations tested induced a decrease in sperm kinects parameters ($p < 0.05$).

Table 1. Sperm motility parameters of sperm incubated in different concentrations of Res and LNC-Res on motility and progressive motility of bovine sperm cells after 15 minutes (A) and 60 minutes (B) incubation periods.

A

Groups (μM)	Treatment	Motility (%)	Progressive Motility (%)
0	-	$55,69 \pm 1,11^a$	$38,54 \pm 1,65^{bc}$
5	Res	$46,86 \pm 1,25^c$	$32,92 \pm 1,35^c$
	LNC-Res	$47,65 \pm 1,01^{bc}$	$34,53 \pm 1,04^c$
25	Res	$38,81 \pm 1,05^d$	$22,55 \pm 0,97^d$
	LNC-Res	$48,76 \pm 0,94^{bc}$	$34,85 \pm 1,07^c$
50	Res	$33,87 \pm 1,04^d$	$18,60 \pm 1,07^d$
	LNC-Res	$46,62 \pm 1,17^c$	$37,75 \pm 1,16^{bc}$
100	Res	$38,21 \pm 1,47^d$	$19,17 \pm 19,17^d$
	LNC-Res	$51,06 \pm 1,19^{ab}$	$40,56 \pm 1,28^b$
200	Res	$20,27 \pm 1,05^e$	$6,94 \pm 0,84^e$
	LNC-Res	$52,69 \pm 1,21^{ab}$	$43,09 \pm 1,24^b$
400	Res	$13,25 \pm 1,01^f$	$2,61 \pm 0,48^e$
	LNC-Res	$56,41 \pm 1,34^a$	$49,76 \pm 1,32^a$

B

Groups (μM)	Treatment	Motility (%)	Progressive Motility (%)
0	-	$44,65 \pm 1,18^a$	$28,63 \pm 1,26^a$
5	Res	$31,22 \pm 0,89^{cd}$	$15,34 \pm 0,87^{cd}$
	LNC-Res	$37,09 \pm 1,00^b$	$21,08 \pm 0,91^b$
25	Res	$29,81 \pm 0,96^{cd}$	$13,37 \pm 0,77^d$
	LNC-Res	$33,94 \pm 1,03^{bc}$	$21,32 \pm 0,92^b$
50	Res	$27,22 \pm 0,81^{de}$	$12,07 \pm 0,90^{de}$
	LNC-Res	$30,07 \pm 1,15^{cd}$	$20,43 \pm 0,99^b$
100	Res	$23,27 \pm 0,92^{ef}$	$8,39 \pm 0,50^e$
	LNC-Res	$27,63 \pm 1,10^{de}$	$19,24 \pm 1,15^{bc}$
200	Res	$12,61 \pm 0,74^g$	$2,81 \pm 0,37^f$
	LNC-Res	$21,38 \pm 1,29^f$	$13,99 \pm 1,05^d$
400	Res	$10,06 \pm 0,72^g$	$2,34 \pm 0,35^f$
	LNC-Res	$21,82 \pm 1,29^f$	$13,45 \pm 1,27^d$

Data shown as Mean $\pm$ Standard Error. N= 3 bull semen samples; $p>0,05$

3.3. Membrane integrity

After 15 minutes of incubation, no detrimental effects of both RES and LNC-RES on sperm membrane integrity was observed (Fig. 1A). When compared to the control group after 60 minutes, a significant decrease of percentage of spermatozoa with intact membrane was observed in the LNC-RES treatment at concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 μM ($p < 0.05$, Fig. 1B).

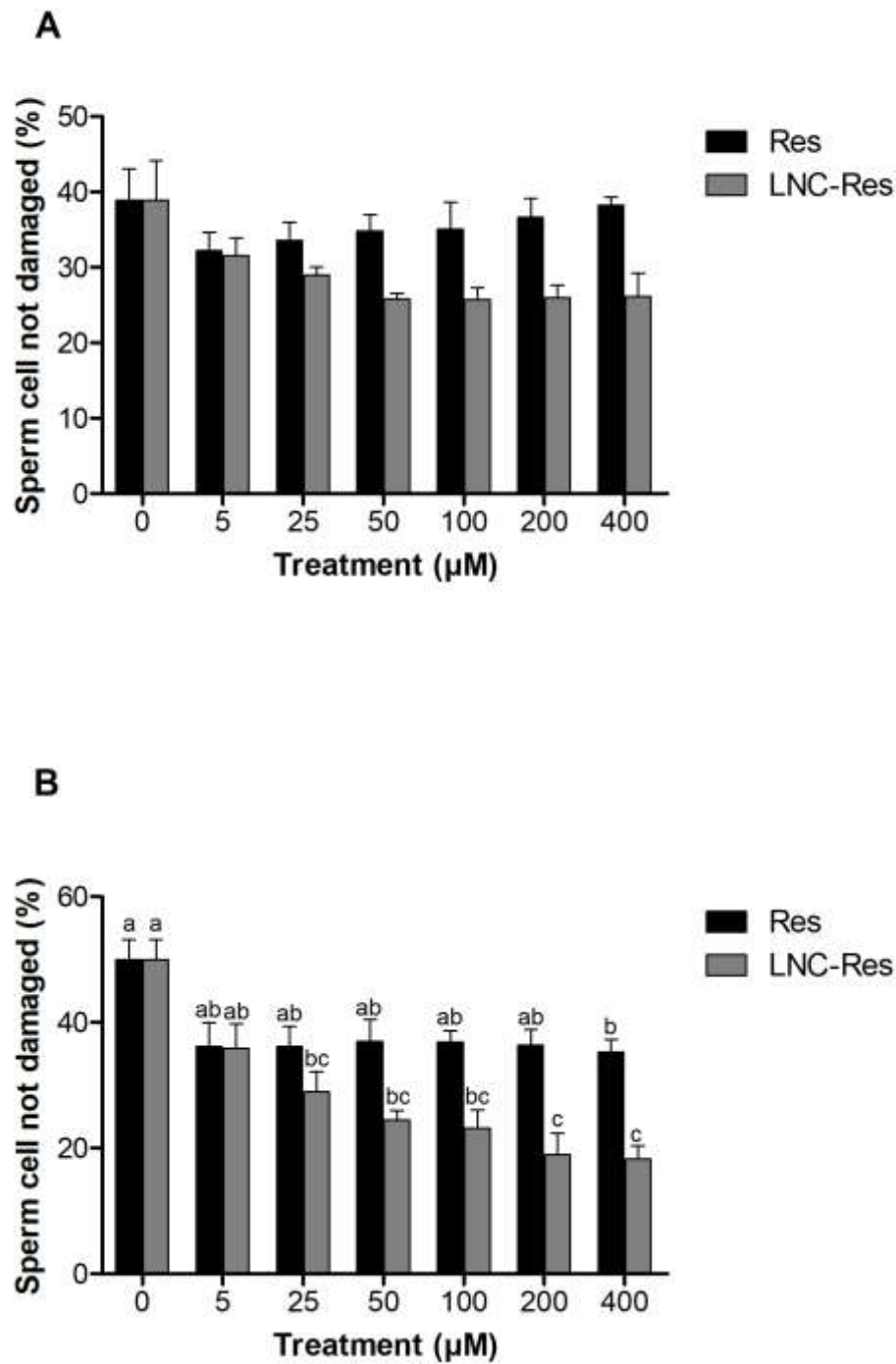


Figure 1. Sperm membrane integrity evaluation in the experimental groups Res and LNC-Res at concentrations of 0, 5, 25, 50, 100, 200 and 400 µM at 15 minute (A) and 60 minutes incubation periods (B). Different letters indicate significant difference between experimental groups ($P < 0.05$). Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM).

3.3.1. DNA fragmentation

Observing the analyzes of DNA fragmentation index, none of the concentrations tested showed statistically significant difference ($p > 0.05$) in comparison to the control in both incubation times (Figs. 2A and 2B).

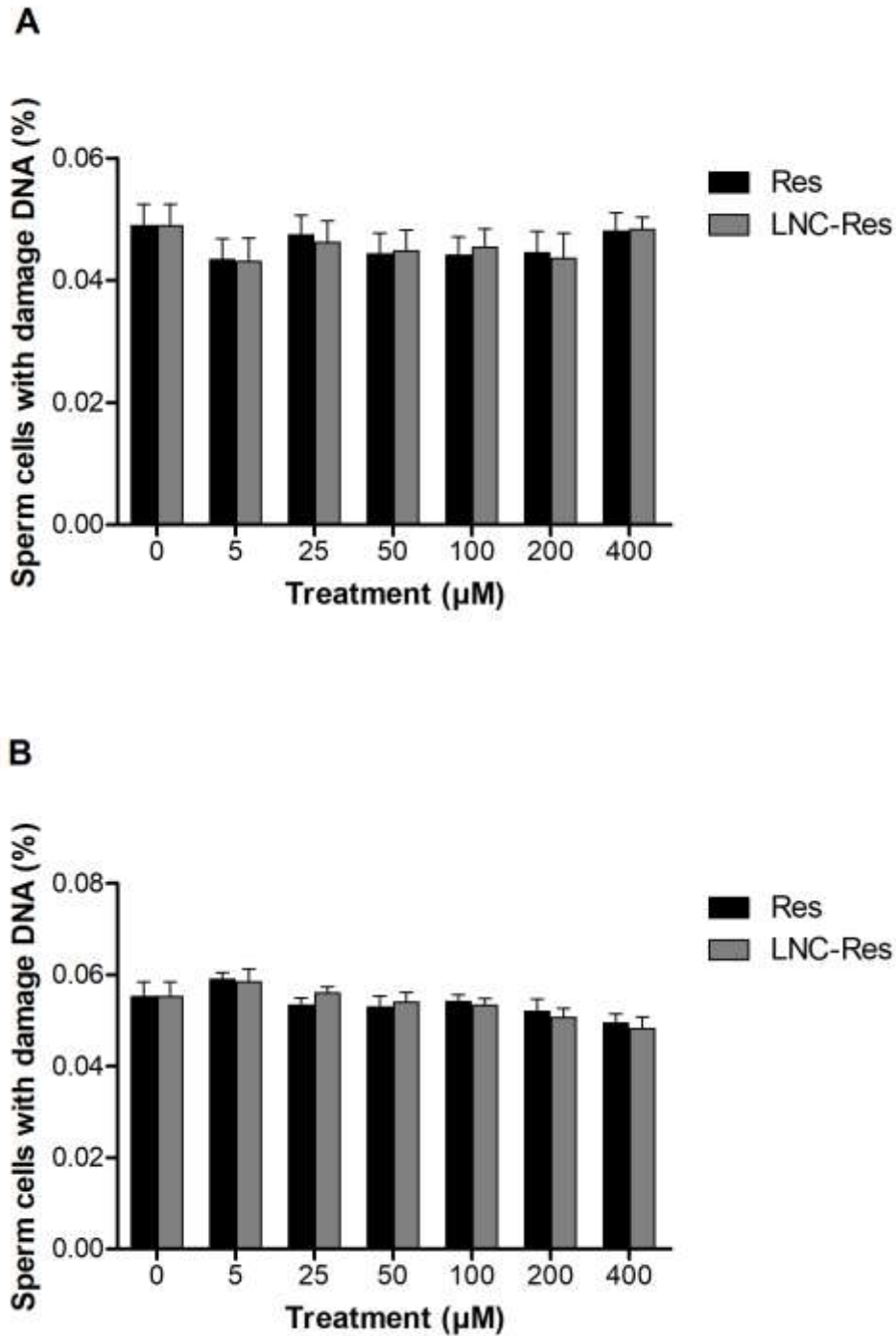
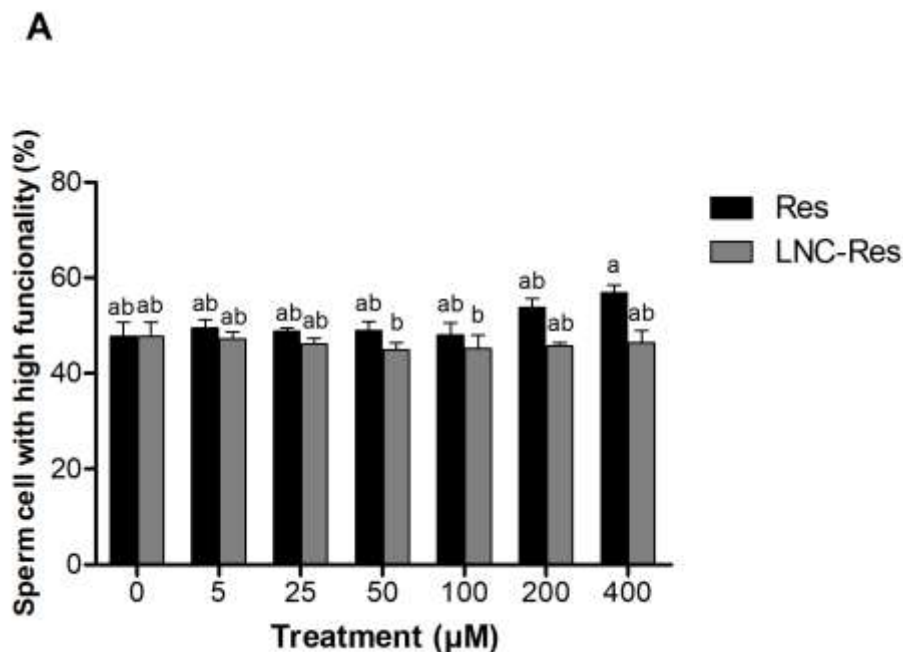


Figure 2. Evaluation of DNA Fragmentation Index in the Res and LNC-Res experimental groups at concentrations of 0, 5, 25, 50, 100, 200 and 400 μM

at 15 minutes (A) and 60 minutes incubation (B). Different letters indicate significant difference between experimental groups ($P < 0.05$). Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM).

3.3.2. Mitochondrial functionality

Analyzing the results of the sperm mitochondrial functionality (Figure 3) can be observed that after 15 minutes of incubation (Fig. 3A), none of the experimental groups showed statistical difference when compared to the control ($p > 0.05$). It was possible to observe that the LNC-Res in concentration of 50 and 100 μ M presented significant difference when compared to the treatment of Res in concentration of 400 μ M ($p < 0.05$). After 60 minutes (Fig. 3B), none of the treatments presented statistical difference in comparisons with control ($p < 0.05$).



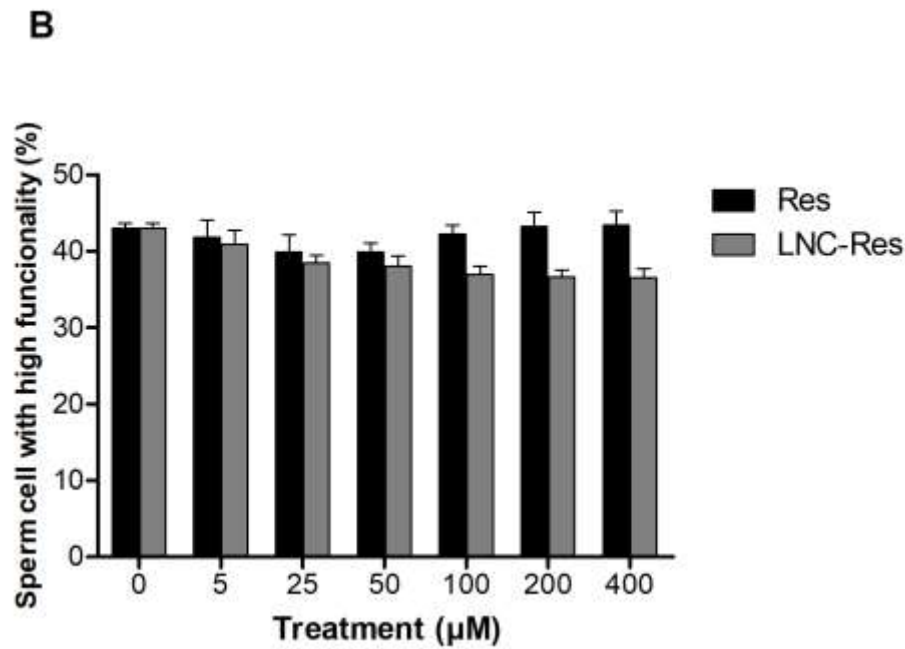


Figure 3. Evaluation of mitochondrial integrity in the Res and LNC-Res experimental groups at concentrations of 0, 5, 25, 50, 100, 200 and 400 µM at 15 minutes (A) and 60 minutes incubation (B). Different letters indicate significant difference between experimental groups ($p < 0.05$). Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM).

3.3.3. Lipid peroxidation

In the lipid peroxidation analyses (Figures 4A and 4B), observing figure 4 which shows the graph of the analyses performed after 15 and 60 minutes of incubation, all the treatments tested decreased the spermatozoa percentage of lipid peroxidation when compared to the control group ($p < 0.05$). Interestingly, concentrations of LNC-Res 200 and 400 µM led to a lower percentage of spermatozoa exhibiting lipid peroxidation when compared to their free form at the same concentrations ($p < 0.05$).

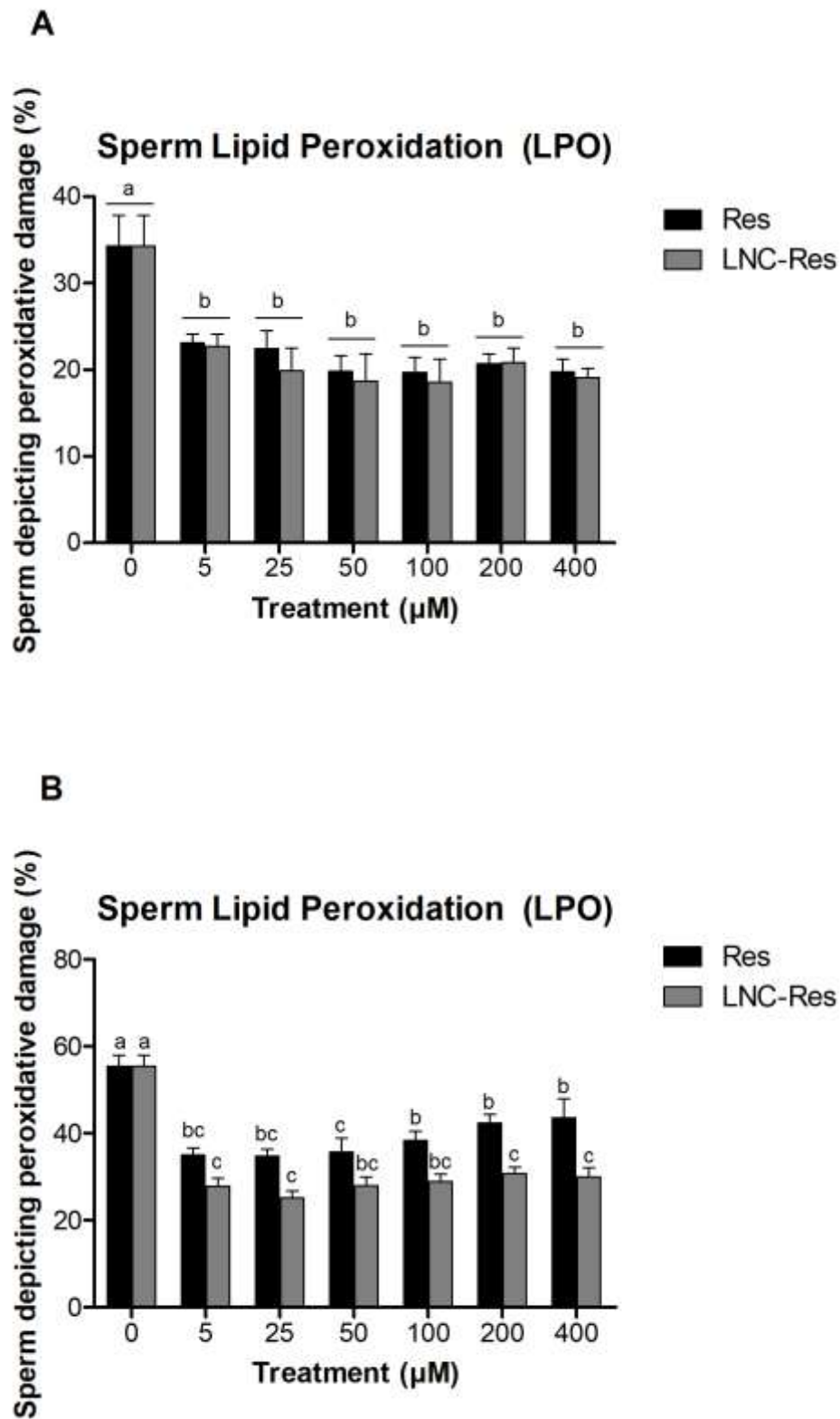
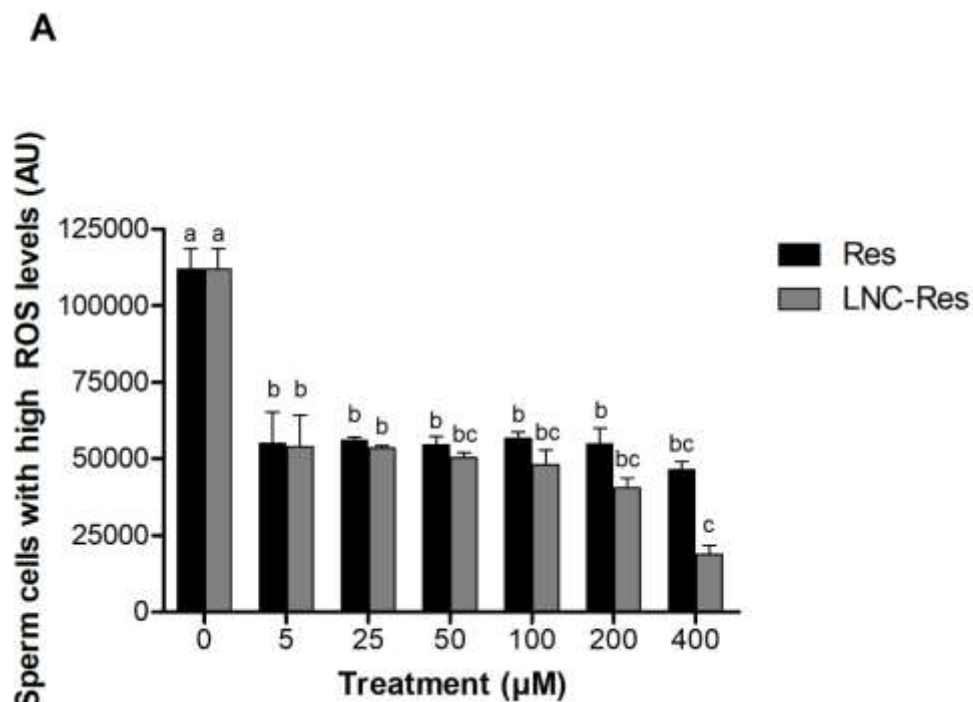


Figure 4. Lipid peroxidation analyses, where sperm depicting peroxidative damage (%) were observed using the Res and LNC-Res treatments at the concentrations 0, 5, 25, 50, 100, 200 and 400 μM at the 15 minutes (A) and 60 minutes (B). Different letters indicate significant difference between

experimental groups ($P < 0.05$). Data are expressed as means $\pm$ standard error of the mean (SEM).

3.3.4. Reactive oxygen species (ROS) production

In the ROS analyses, a significant decrease of ROS levels were observed after 15 minutes of incubation with all Res and LNC-Res concentrations (Fig. 5A) when compared to the control. The LNC-Res in the concentration of 400 μM differed from the Res and LNC-Res in the concentrations 5 and 25 μM , but also presented statistical difference of the treatments with Res in the concentrations of 50, 100 and 200 μM ($p < 0.05$). After 60 minutes (Figure 5B), a statistical difference was observed in all treatments when compared to the control experimental group ($p > 0.05$).



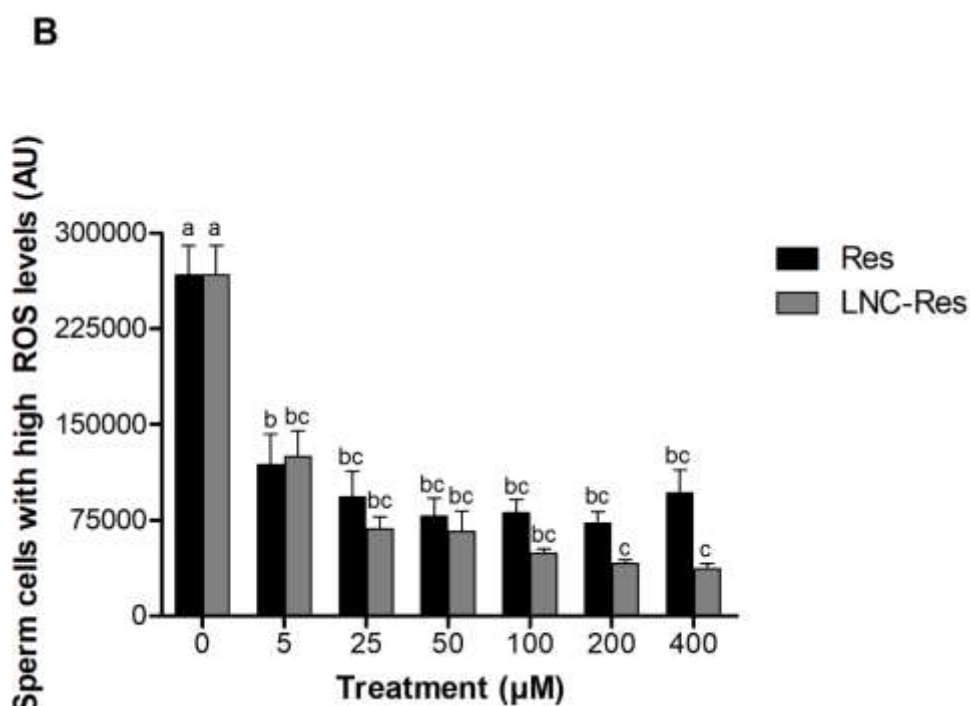


Figure 5. Reactive oxygen species (ROS) production evaluation in the experimental groups Res and LNC-Res at concentrations of 0, 5, 25, 50, 100, 200 and 400 μM at 15 minute (A) and 60 minutes incubation times (B). Different letters indicate significant difference between experimental groups ($P < 0.05$). Data are expressed as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM).

4. Discussion

Observing the sperm motility and progressive sperm motility, it can be observed that in 15 minutes of incubation all the treatments using res presented a decrease while the treatments using LNC-Res in concentrations of 100, 200 and 400 μM did not present statistical difference in relation to the control. This similarity to the control can be explained by the fact that the treatment with LNC-Res has a better bioavailability than in its free form, increasing its solubility and promoting better absorption of the drug by the cell (27). In 60 minutes, there is a decrease in both indicated parameters, which is explained by the stress caused by thawing or environmental influences (28).

In the membrane integrity test, after 60 minutes, there was a decrease in the percentage of intact membranes in the treatments using LNC-Res at

concentrations of 25, 50, 100, 200 and 400 μ M. In agreement with these observations, Maxwell and Watson (29) reported in their study the preservation of ram spermatozoa, which shows the rupture of these membranes after thawing after 60 minutes. Due to of its ability to promote the activity of various antioxidant enzymes, helping to maintain some of the mechanisms by which the cells already come (30), but with the incubation time the cell membrane ends up having a decrease in its integrity percentage. When used in its nanoencapsulated form, which has advantages, such as improved bioavailability, it increases the resistance time of the molecule in a way that directs the molecule to where it should be released (6), it protects the cells from the action of free radicals, which generates oxidative stress in spermatozoa, which would lead to an increase in lipid peroxidation (LPO) (31). However, in the LPO analyzes, no increase was identified, it can only be observed that after the incubation, in the 200 and 400 μ M LNC-Res concentrations, the LPO suffered a reduction in its percentage in the cells, in comparison with the same concentrations of Res in its free form, confirming that the LNC-Res has its optimized delivery, helping to protect the sperm cells without causing them any kind of toxicity.

When observed the results obtained in the DNA analyzes, it was noted that there were no statistical differences between the experimental groups, which is explained by the fact that the levels of LPO did not increase, directly influencing the levels of DNA damage(30). These results are in agreement with what Fraser and collaborators (32) found in their research, relating the increase of the LPO in sperm cells of the swine species with the damage of the DNA of these spermatozoa (33). Also, Res may have a protection effect int is groups. This molecule has an ability to prevent the oxidative damage of the target cell DNA, reducing inflammatory responses (34).

Because it is an antioxidant polyphenol, resveratrol has an ability to inhibit the formation of ROS by enzymatic and non-enzymatic systems within cells, more precisely in the mitochondria. Mitochondria are large producers of ROS, which are prevented by the antioxidant effect (35,36). These observed results of the decrease of ROS in all concentrations, is in line with the results obtained by Li and his collaborators (37) where there was a decrease in the concentration of this analysis when the Res was used in its two highest concentrations. The

functionality of the mitochondria is a very important process for the cell to remain with its correct functioning. This organelle plays an important role in the production of ATP through the process of oxidative phosphorylation, causing sperm motility to occur correctly. Another important function performed by mitochondria is the source of reactive oxygen species (ROS) (38). Thus, in the analyzes performed to detect the functionality of the mitochondria, which did not present significant statistical differences in comparison to the control, only difference was observed when incubated for 15 minutes in concentrations of 50 and 100 μ M LNC-Res when compared to Res in its free form at the concentration of 400 μ M, which presented an increase, being able to be explained by the fact that mitochondria produce ROS and resveratrol to be an antioxidant against this production.

5. Conclusion

In conclusion, in addition to not inducing toxicity to bovine spermatozoa, LNC-Res stimulated intracellular antioxidant machinery. Observing the results, it can be said that LNC-Res at the concentration of 400mM was the best tested.

6. References

- Grötter LG, Cattaneo L, Marini PE, Kjelland ME, Ferré LB. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals*. (2019) 54(4):655–65.
- Aitken RJ, Jones KT, Robertson SA. Reactive Oxygen Species and Sperm Function--In Sickness and In Health. *Journal of Andrology*. (2012) 33(6):1096–106.
- Neves AR, Lúcio M, Lima JLC, Reis S. Resveratrol in Medicinal Chemistry : A Critical Review of its Pharmacokinetics , Drug-Delivery , and Membrane Interactions. *Current Medicinal Chemistry*. (2012) 19:1663–81.
- Frozza RL, Bernardi A, Paese K, Hoppe JB, Silva T, Battastini AMO, et al. Characterization of trans -Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. (2010) 6:694–703.
- Goswami SK, Das DK. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Letters*. 2009;284(1):1–6.
- Arora D, Jaglan S. Therapeutic applications of resveratrol nanoformulations. *Environmental Chemistry Letters*. (2017)
- Montsko G, Pour MS, Szabo Z, Boddi K, Lorand T, Ohmacht R, et al. Determination of products derived from trans -resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC – APCI-MS. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. (2008) 196:44–50.

8. Albuquerque RV, Malcher NS, Amado LL, Coleman MD. In Vitro Protective Effect and Antioxidant Mechanism of Resveratrol Induced by Dapsone Hydroxylamine in Human Cells. *PLOS ONE*. (2015) 10(8):1–24.
9. Fauconneau B, Waffo-Teguop P, Huguet F, Barrier L, Decendit A, MJZRILLONT J-M. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis Vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sciences*. (1997) 61(21):2103–10.
10. Csaki C, Mobasheri A, Shakibaei M. Research article Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes: inhibition of IL-1 β -induced NF- κ B-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Research & Therapy*. (2009) 11(6):1–17.
11. Kuhad A, Sethi R, Chopra K. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sciences*. (2008) 83(3–4):128–34.
12. Szkudelska K, Szkudelski T. Resveratrol, obesity and diabetes. *European Journal of Pharmacology*. (2010) 635(1–3):1–8.
13. Shin S, Jeon JH, Park D, Jang M, Choi JH, Choi B, et al. trans -Resveratrol Relaxes the Corpus Cavernosum Ex Vivo and Enhances Testosterone Levels and Sperm Quality In Vivo. *Archives of Pharmacal Research*. (2008) 31(1):83–7.
14. Longobardi V, Zullo G, Salzano A, Canditiis CD, Luise LD, Puzio MV, et al. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*. (2016) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.046>
15. Figueiró F, Bernardi A, Frozza RL, Terroso T, Zanotto-filho A, Jandrey EHF, et al. Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules Treatment Reduces In Vitro and In Vivo Glioma Growth. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. (2013) 9:516–26.
16. Coradini K, Friedrich RB, Fonseca FN, Marina S, Andrade DF, Oliveira CM, et al. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: in vivo studies. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*. (2015) DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.07.012>
17. QINGRONG HUANG, HAILONG YU AQR. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *Journal of Food Science*. (2010) 75(1):50–7.
18. Lucas CG, Remião MH, Komninou ER, Domingues WB, Haas C, Leon PMM de, et al. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules decrease reactive oxygen species levels and improve bovine embryonic development during in vitro oocyte maturation. *Reproductive Toxicology*. (2015) 58:131–9.
19. Remião MH, Lucas CG, Domingues WB, Silveira T, Barther NN, Komninou ER, et al. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reproductive Toxicology*. (2016) 63:70–81.
20. Komninou ER, Remião MH, Lucas CG, Domingues WB, Basso AC, Jornada DS, et al. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. Kues WA, organizador. *PLOS ONE*. (2016) 11(6):1–19.
21. Silva, ACJ, Remirão MH, Lucas CG, Domingues WB, Silveira T, Paschoal JD, et al. Effects of chitosan-coated lipid-core nanocapsules on bovine sperm cells. *Toxicology in Vitro*. (2017) 40:214–22.
22. Gillan L, Evans G, Maxwell WMC. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*. (2005) 63:445–57.
23. Fernández-Gago R, Carlos J, Martínez-pastor F. Theriogenology Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: A flow cytometry study. *Theriogenology*. (2013) 1–11.

24. Evenson DP, Larson KL, Jost LK. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology*. (2002) 23(1):25–43.
25. Hagedorn M, McCarthy M, Carter VL, Meyers SA. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PLOS ONE*. (2012) 7(6):2–12.
26. Dominguez-Rebolledo et al. Response of Thawed Epididymal Red Deer Spermatozoa to Increasing Concentrations of Hydrogen Peroxide , and Importance of Individual Male Variability. *Reproduction in Domestic Animals*. (2011) 46:393–403.
27. Davidov-pardo G, McClements DJ. Resveratrol encapsulation : Designing delivery systems to overcome solubility , stability and bioavailability issues. *Trends in Food Science & Technology*. (2014) xxx:1–16.
28. Martínez-Pastor F, Tizado EJ, Garde JJ, Anel L, de Paz P. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis¹¹This article is part of the Statistical Series guest-edited by Szabolcs Nagy. *Theriogenology*. (2011) 75(5):783–95.
29. Maxwell WMC, Watson PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science*. (1996) 42:55–65.
30. Lastra D, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions*. (2007) 35:1156–60.
31. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*. (2004) 2(1):12.
32. Fraser L, Wasilewska K, Pareek CS. Sperm DNA damage in relation to lipid peroxidation following freezing-thawing of boar semen. *South African Journal of Animal Science*. (2017) 47(2):213–8.
33. Kothari S, Thompson A, Agarwal A, Plessis SS. Free radicals : Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian Journal of Experimental Biology (IJEB)* (2010) 48:425–35.
34. Kumar J, Surh Y. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol : Mechanistic perspectives. *Cancer Letters*. (2008) 269:243–61.
35. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology*. (2003) 2:335–44.
36. Silva ECB, Cajueiro JFP, Silva SV, Soares PC, Guerra MMP. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*. (2012) 77:1722–6.
37. Li C-Y, Zhao Y-H, Hao H-S, Wang H-Y, Huang J-M, Yan C-L, et al. Resveratrol significantly improves the fertilisation capacity of bovine sex-sorted semen by inhibiting apoptosis and lipid peroxidation. *Scientific Reports*. (2018) 8(1):1–10.
38. Ferramosca A, Zara V, Ferramosca A, Zara V. Mitochondria and fertility: the mitochondria critical role on spermatozoa function. *Journal of Interdisciplinary Research Applied to Medicine*. (2017) 1(1):21–6.
39. Davis BK. Timing of fertilization in mammals: Sperm cholesterol / phospholipid ratio as a determinant of the capacitation interval. (1981) 78(12):7560–4.

5. CONCLUSÃO

Em conclusão, podemos destacar que os espermatozoides bovinos criopreservados podem realmente ser utilizados para obtenção de respostas através de seus parâmetros quando observadas as diferentes concentrações. No trabalho realizado concluímos que o composto em questão, o resveratrol não induziu toxicidade às células espermáticas bovinas e foi observado que este composto em sua forma nanoencapsulada estimulou a maquinaria antioxidante intracelular gerando uma proteção para a elas principalmente na concentração de 400 μ M no LNC-Res.

6. REFERÊNCIAS

- Aitken, R.J., Jones, K.T., Robertson, S.A., 2012. Reactive Oxygen Species and Sperm Function--In Sickness and In Health. *Journal of Andrology* 33, 1096–1106. <https://doi.org/10.2164/jandrol.112.016535>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., 2002. *Molecular Biology of the Cell*, 4th ed. Garland Science, New York.
- Albuquerque, R.V., Malcher, N.S., Amado, L.L., Coleman, M.D., 2015. In Vitro Protective Effect and Antioxidant Mechanism of Resveratrol Induced by Dapsone Hydroxylamine in Human Cells. *PLOS ONE* 10, 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134768>
- Arora, D., Jaglan, S., 2017. Therapeutic applications of resveratrol nanoformulations. *Environmental Chemistry Letters*. <https://doi.org/10.1007/s10311-017-0660-0>
- Bastianetto, S., Zheng, W.-H., Quirion, R., 2000. Neuroprotective abilities of resveratrol and other red wine constituents against nitric oxide-related toxicity in cultured hippocampal neurons. *British Journal of Pharmacology* 131, 711–720. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703626>
- Bradamante, S., Barengi, L., Villa, A., 2004. Cardiovascular Protective Effects of Resveratrol. *Cardiovascular Drug Reviews* 22, 169–188. <https://doi.org/10.1111/j.1527-3466.2004.tb00139.x>
- Braga, M.R., Dietrich, S.M.C., 1987. Defesas químicas de plantas: fitoalexinas. *Acta Botanica Brasilica* 1, 3–16. <https://doi.org/10.1590/S0102-33061987000100002>
- Chen, Y., Chen, H., Shi, J., 2014. Inorganic Nanoparticle-Based Drug Codelivery Nanosystems To Overcome the Multidrug Resistance of Cancer Cells. *Molecular Pharmaceutics* 11, 2495–2510. <https://doi.org/10.1021/mp400596v>
- Cho, H., Lai, T.C., Tomoda, K., Kwon, G.S., 2015. Polymeric Micelles for Multi-Drug Delivery in Cancer. *AAPS PharmSciTech* 16, 10–20. <https://doi.org/10.1208/s12249-014-0251-3>
- Coradini, K., Friedrich, R.B., Fonseca, F.N., Marina, S., Andrade, D.F., Oliveira, C.M., Battistel, A.P., Silvia, S., Izabel, M., Rocha, U.M., Pohlmann, A.R., Beck, R.C.R., 2015. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules : in vivo studies. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*. <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2015.07.012>
- Csaki, C., Mobasheri, A., Shakibaei, M., 2009. Research article Synergistic chondroprotective effects of curcumin and resveratrol in human articular chondrocytes : inhibition of IL-1 β -induced NF- κ B-mediated inflammation and apoptosis. *Arthritis Research & Therapy* 11, 1–17. <https://doi.org/10.1186/ar2850>
- Davidov-pardo, G., McClements, D.J., 2014. Resveratrol encapsulation : Designing delivery systems to overcome solubility , stability and bioavailability issues. *Trends in Food Science & Technology* xxx, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.05.003>
- de Lamirande, E., Gagnon, C., 1995. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Human Reproduction* 10, 15–21. https://doi.org/10.1093/humrep/10.suppl_1.15
- Dominguez-Rebolledo, et al., 2011. Response of Thawed Epididymal Red Deer Spermatozoa to Increasing Concentrations of Hydrogen Peroxide , and Importance of Individual Male Variability. *Reproduction in Domestic Animals* 46, 393–403. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01677.x>
- Evenson, D.P., Larson, K.L., Jost, L.K., 2002. Sperm Chromatin Structure Assay: Its Clinical Use for Detecting Sperm DNA Fragmentation in Male Infertility and Comparisons With Other Techniques. *Journal of Andrology* 23, 25–43. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02599.x>
- Farokhzad, O.C., Langer, R., 2009. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery. *ACS Nano* 3, 16–20. <https://doi.org/10.1021/nn900002m>

- Fauconneau, B., Waffo-Teguop, P., Huguet, F., Barrier, L., Decendit, A., MJZRILLONt, J.-M., 1997. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis Vinifera* cell cultures using in vitro tests. *Life Sciences* 61, 2103–2110.
- Fernández-Gago, R., Carlos, J., Martínez-pastor, F., 2013. Theriogenology Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology : A fl ow cytometry study. *Theriogenology* xxx, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.05.003>
- Ferramosca, A., Provenzano, S.P., Coppola, L., Zara, V., 2012. Mitochondrial Respiratory Efficiency is Positively Correlated With Human Sperm Motility. *Urology* 79, 809–814. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.12.042>
- Ferramosca, A., Zara, V., 2014. Bioenergetics of Mammalian Sperm Capacitation. *BioMed Research International* 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/902953>
- Ferramosca, A., Zara, V., Ferramosca, A., Zara, V., 2017. Mitochondria and fertility: the mitochondria critical role on spermatozoa function. *Journal of interDisciplinary REsearch Applied to Medicine* 1, 21–26. <https://doi.org/10.1285/i>
- Figueiró, F., Bernardi, A., Frozza, R.L., Terroso, T., Zannotto-filho, A., Jandrey, E.H.F., Moreira, J.C.F., Salbego, C.G., Edelweiss, M.I., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Battastini, A.M.O., 2013. Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules Treatment Reduces In Vitro and In Vivo Glioma Growth. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 9, 516–526. <https://doi.org/10.1166/jbn.2013.1547>
- Fraser, L., Wasilewska, K., Pareek, C.S., 2017. Sperm DNA damage in relation to lipid peroxidation following freezing-thawing of boar semen. *South African Journal of Animal Science* 47, 213–218.
- Frozza, R.L., Bernardi, A., Paese, K., Hoppe, J.B., Silva, T., Battastini, A.M.O., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Salbego, C., 2010. Characterization of trans -Resveratrol-Loaded Lipid-Core Nanocapsules and Tissue Distribution Studies in Rats. *Journal of Biomedical Nanotechnology* 6, 694–703. <https://doi.org/10.1166/jbn.2010.1161>
- Gillan, L., Evans, G., Maxwell, W.M.C., 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63, 445–457. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.024>
- Goldberg, M., Langer, R., Jia, X., 2007. Nanostructured materials for applications in drug delivery and tissue engineering. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 18, 241–268. <https://doi.org/10.1163/156856207779996931>
- Goswami, S.K., Das, D.K., 2009. Resveratrol and chemoprevention. *Cancer Letters* 284, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2009.01.041>
- Grötter, L.G., Cattaneo, L., Marini, P.E., Kjelland, M.E., Ferré, L.B., 2019. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. *Reproduction in Domestic Animals* 54, 655–665. <https://doi.org/10.1111/rda.13409>
- Hagedorn, M., Mccarthy, M., Carter, V.L., Meyers, S.A., 2012. Oxidative Stress in Zebrafish (*Danio rerio*) Sperm. *PLOS ONE* 7, 2–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039397>
- HARRISON, R.A., 1997. Sperm plasma membrane characteristics and boar semen fertility. *Journal of reproduction and fertility.* 52, 195–211.
- Hnawate, R.M., 2017. Nanoparticle - novel drug delivery system: A Review 5, 15.
- Komninou, E.R., Remião, M.H., Lucas, C.G., Domingues, W.B., Basso, A.C., Jornada, D.S., Deschamps, J.C., Beck, R.C.R., Pohlmann, A.R., Bordinon, V., Seixas, F.K., Campos, V.F., Guterres, S.S., Collares, T., 2016. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. *PLOS ONE* 11, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157561>
- Kothari, S., Thompson, A., Agarwal, A., Plessis, S.S., 2010. Free radicals : Their beneficial and detrimental effects on sperm function 48, 425–435.
- Kuhad, A., Sethi, R., Chopra, K., 2008. Lycopene attenuates diabetes-associated cognitive decline in rats. *Life Sciences* 83, 128–134. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2008.05.013>
- Kumar, J., Surh, Y., 2008. Cancer chemopreventive and therapeutic potential of resveratrol : Mechanistic perspectives. *Cancer Letters* 269, 243–261. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.03.057>

- Lastra, D., Villegas, I., 2007. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent : mechanisms and clinical implications. *Biochemical Society Transactions* 35, 1156–1160.
- Leonard, S.S., Xia, C., Jiang, B.-H., Stinefelt, B., Klandorf, H., Harris, G.K., Shi, X., 2003. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 309, 1017–1026. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.105>
- Li, C.-Y., Zhao, Y.-H., Hao, H.-S., Wang, H.-Y., Huang, J.-M., Yan, C.-L., Du, W.-H., Pang, Y.-W., Zhang, P.-P., Liu, Y., Zhu, H.-B., Zhao, X.-M., 2018. Resveratrol significantly improves the fertilisation capacity of bovine sex-sorted semen by inhibiting apoptosis and lipid peroxidation. *Scientific Reports* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25687-z>
- Liong, M., Lu, J., Kovochich, M., Xia, T., Ruehm, S.G., Nel, A.E., Tamanoi, F., Zink, J.I., 2008. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. *ACS Nano* 2, 889–896. <https://doi.org/10.1021/nn800072t>
- Longobardi, V., Zullo, G., Salzano, A., Canditiis, C.D., Luise, L.D., Puzio, M.V., Neglia, G., Gasparrini, B., 2016. Resveratrol prevents capacitation-like changes and improves in vitro fertilizing capability of buffalo frozen-thawed sperm. *Theriogenology*. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.09.046>
- Lucas, C.G., Remião, M.H., Komninou, E.R., Domingues, W.B., Haas, C., Leon, P.M.M. de, Campos, V.F., Ourique, A., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Basso, A.C., Seixas, F.K., Beck, R.C.R., Collares, T., 2015. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules decrease reactive oxygen species levels and improve bovine embryonic development during in vitro oocyte maturation. *Reproductive Toxicology* 58, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.10.004>
- Makino, A., Hara, E., Hara, I., Ozeki, E., Kimura, S., 2014. Size Control of Core–Shell-type Polymeric Micelle with a Nanometer Precision. *Langmuir* 30, 669–674. <https://doi.org/10.1021/la404488n>
- Manaskova, P., Balinova, P., Kraus, M., Ticha, M., Jonakova, V., 2003. Mutual Interactions of Boar Seminal Plasma Proteins Studied by Immunological and Chromatographic Methods. *American Journal of Reproductive Immunology* 50, 399–410. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0897.2003.00098.x>
- Martínez-Pastor, F., Tizado, E.J., Garde, J.J., Anel, L., de Paz, P., 2011. Statistical Series: Opportunities and challenges of sperm motility subpopulation analysis. This article is part of the Statistical Series guest-edited by Szabolcs Nagy. *Theriogenology* 75, 783–795. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.11.034>
- Maxwell, W.M.C., Watson, P.F., 1996. Recent progress in the preservation of ram semen. *Animal Reproduction Science* 42, 55–65. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01544-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01544-8)
- Montsko, G., Pour, M.S., Szabo, Z., Boddie, K., Lorand, T., Ohmacht, R., Mark, L., 2008. Determination of products derived from trans -resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC – APCI-MS. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* 196, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2007.11.011>
- Müller, C.R., Bassani, V.L., Pohlmann, A.R., Michalowski, C.B., Petrovick, P.R., Guterres, S.S., 2000. Preparation and Characterization of Spray-Dried Polymeric Nanocapsules. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 26, 343–347. <https://doi.org/10.1081/DDC-100100363>
- Neves, A.R., Lúcio, M., Lima, J.L.C., Reis, S., 2012. Resveratrol in Medicinal Chemistry : A Critical Review of its Pharmacokinetics , Drug-Delivery , and Membrane Interactions. *Current Medicinal Chemistry* 19, 1663–1681.
- Ojea-Jimenez, I., Comenge, J., Garcia-Fernandez, L., Megson, Z., Casals, E., Puentes, V., 2013. Engineered Inorganic Nanoparticles for Drug Delivery Applications. *Current Drug Metabolism* 14, 518–530. <https://doi.org/10.2174/13892002113149990008>
- OpenStax, 2016. *Anatomy and Physiology*.
- Peña, F., 2003. Assessment of fresh and frozen–thawed boar semen using an Annexin-V assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology* 60, 677–689. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(03\)00081-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(03)00081-5)
- Pushpalatha, R., Pharm, M., Selvamuthukumar, S., Pharm, M., Assistant, P.D., Kilimozhi, D., Pharm, M., Assistant, P.D., 2017. *Journal of Drug Delivery Science and Technology Nanocarrier*

- mediated combination drug delivery for chemotherapy e A review. *Journal of Drug Delivery Science and Technology* 39, 362–371. <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2017.04.019>
- QINGRONG HUANG, HAILONG YU, A.Q.R., 2010. Bioavailability and Delivery of Nutraceuticals Using Nanotechnology. *Journal of Food Science* 75, 50–57. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01457.x>
- Rao, D.A., Nguyen, D.X., Mishra, G.P., Doddapaneni, B.S., Alani, A.W.G., 2015. Preparation and Characterization of Individual and Multi-drug Loaded Physically Entrapped Polymeric Micelles. *Journal of Visualized Experiments*. <https://doi.org/10.3791/53047>
- Remião, M.H., Lucas, C.G., Domingues, W.B., Silveira, T., Barther, N.N., Komninou, E.R., Basso, A.C., Jornada, D.S., Beck, R.C.R., Pohlmann, A.R., Junior, A.S.V., Seixas, F.K., Campos, V.F., Guterres, S.S., Collares, T., 2016. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reproductive Toxicology* 63, 70–81. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.016>
- Renaud, S., de Lorgeril, M., 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339, 1523–1526. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(92\)91277-F](https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)91277-F)
- Roco, M.C., 2003. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology* 14, 337–346. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(03\)00068-5](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(03)00068-5)
- Safari, J., Zarnegar, Z., 2014. Advanced drug delivery systems: Nanotechnology of health design A review. *Journal of Saudi Chemical Society* 18, 85–99. <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2012.12.009>
- Sahoo, S.K., Labhasetwar, V., 2003. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discovery Today* 8, 1112–1120. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(03\)02903-9](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(03)02903-9)
- Sanocka, D., Kurpysz, M., 2004. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2, 12.
- Seaton, A., Tran, L., Aitken, R., Donaldson, K., 2010. Nanoparticles, human health hazard and regulation. *Journal of the Royal Society Interface*. 7, 119–129.
- Shin, S., Jeon, J.H., Park, D., Jang, M., Choi, J.H., Choi, B., Soo, S., Nahm, S., Kim, J., Kim, Y., 2008. trans -Resveratrol Relaxes the Corpus Cavernosum Ex Vivo and Enhances Testosterone Levels and Sperm Quality In Vivo. *Archives of Pharmacal Research* 31, 83–87. <https://doi.org/10.1007/s12272-008-1124-7>
- Silva, A.C.J., A., Remirão, M.H., Lucas, C.G., Domingues, W.B., Silveira, T., Paschoal, J.D., Jornada, D.S., Corcine, C.D., Junior, A.S.V., Prado, W.A., Campos, V.F., Seixas, F.K., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., Collares, T., 2017. Effects of chitosan-coated lipid-core nanocapsules on bovine sperm cells. *Toxicology in Vitro* 40, 214–222. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.01.017>
- Silva, E.C.B., Cajueiro, J.F.P., Silva, S.V., Soares, P.C., Guerra, M.M.P., 2012. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology* 77, 1722–1726. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.11.023>
- Stervbo, U., Vang, O., Bonnesen, C., 2007. A review of the content of the putative chemopreventive phytoalexin resveratrol in red wine. *Food Chemistry* 101, 449–457. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.047>
- Szkudelska, K., Szkudelski, T., 2010. Resveratrol , obesity and diabetes. *European Journal of Pharmacology* 635, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.02.054>
- Tekade, R.K., Dutta, T., Gajbhiye, V., Jain, N.K., 2009. Exploring dendrimer towards dual drug delivery: pH responsive simultaneous drug-release kinetics. *Journal of Microencapsulation* 26, 287–296. <https://doi.org/10.1080/02652040802312572>
- Turrens, J.F., 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* 2, 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>
- Vian, M.A., Tomao, V., Gallet, S., Coulomb, P.O., Lacombe, J.M., 2005. Simple and rapid method for cis- and trans-resveratrol and piceid isomers determination in wine by high-performance liquid chromatography using Chromolith columns. *Journal of Chromatography A* 1085, 224–229. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.05.083>
- Wagner, V., Dullaart, A., Bock, A.-K., Zweck, A., 2006. The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology* 24, 1211–1217. <https://doi.org/10.1038/nbt1006-1211>

1278 Wilkinson, J.M., 2003. Nanotechnology applications in medicine. Medical device technology 14, 29–
1279 31.
1280