

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Efeito toxicológico de nanocápsulas de núcleo  
lipídico revestidas de quitosana sobre  
espermatozoides bovinos**

**Arthur de Castro Jorge Silva**

Pelotas, 2017

**Arthur de Castro Jorge Silva**

**Efeito toxicológico de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas de quitosana  
sobre espermatozoides bovinos**

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 (Biotecnologia).

**Orientador:** Dr. Tiago Veiras Collares  
**Coorientadores:** Dr. Vinicius Farias Campos

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

S586e Silva, Arthur de Castro Jorge

Efeito toxicológico de nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas de quitosana sobre espermatozoides bovinos / Arthur de Castro Jorge Silva ; Tiago Collares, orientador ; Vinicius Farias Campos, coorientador. — Pelotas, 2017.

62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Nanobiotecnologia. 2. Citometria. 3. Motilidade. 4. Morfologia. 5. Toxicologia. I. Collares, Tiago, orient. II. Campos, Vinicius Farias, coorient. III. Título.

CDD : 620.5

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. Tiago Veiras Collares

Prof. Dr. Vinicius Farias Campos

Prof. Dr<sup>a</sup>. Karine Rech Begnini

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Dedico esta dissertação aos meus pais.

## **Agradecimentos**

À Deus por todas as conquistas e sonhos realizados, dificuldades vencidas e metas alcançadas, e por toda trajetória que fiz, e só pude fazê-lo com Sua ajuda.

Ao meus pais, por todo esforço em me educar, por seus conselhos que sempre me ajudaram, por toda a esperança e fé em mim que me levantaram mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha família, que sempre me recebeu de braços abertos nas poucas vezes que pude visitá-los, e por fazerem parte das melhores recordações.

Aos meus amigos, pelas risadas compartilhadas, pelo apoio mútuo, por todas as conversas e por terem feito esses dois anos mais alegres.

À Giana por me mostrar o que é amor, por ser a pessoa mais especial que já encontrei. Por me aceitar como sou, mas me ajudar a ser melhor. Que foi acima de tudo companheira. Por estar comigo nas horas mais escuras e por ser parte dos momentos mais felizes.

Aos colegas de laboratório por cada ajuda e ensinamento. Aos professores que exerceram sua profissão com amor e nos fizeram assim amar o conhecimento dado. Aos servidores pela prestação e ética exímias.

À CAPES, UFPel e aos governos de Lula e Dilma por me proporcionarem o acesso ao ensino superior com qualidade, por me proporcionarem a melhor experiência da vida durante o intercâmbio, e pelo projeto de governo que viabilizou as bolsas e incentivos à pesquisa.

A todos que colaboraram um muito obrigado!

Little by little, one travels far”

J. R. R. Tolkien

## Resumo

DE CASTRO JORGE SILVA, Arthur. **Efeito de nanocápsulas de núcleo lipídico com e sem revestimento de quitosana em espermatozoide bovino.** 2017. 62f. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A nanobiotecnologia é uma área em ascensão, com o surgimento contínuo de novos sistemas para melhorar a eficiência de drogas e terapias. Dentre os novos nanossistemas desenvolvidos as nanocápsulas de núcleo lipídico destacam-se pela capacidade de carrear diferentes tipos de moléculas em seu núcleo ou aderidas à sua superfície. Para que esse e outros novos sistemas sejam empregados comercialmente é preciso comprovar sua atoxicidade e inocuidade animal e ambiental. Suprindo essa necessidade emergente, a toxicologia busca o uso de modelos mais rápidos para triagem, como a utilização de gametas masculinos e a avaliação de parâmetros de fertilidade. Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito de dois nanossistemas de nanocápsulas de núcleo lipídico, compostas por monoestearato de sorbitano, triglicerídeos cáprico-caprílico, policaprolactona, lecitina e polissorbato, e a segunda estrutura revestida por quitosana, em espermatozoides bovinos para avaliação da toxicidade através de parâmetros de qualidade espermática. A avaliação do perfil e distribuição do tamanho das nanocápsulas foi realizada por difração à laser e espalhamento dinâmico de luz, o potencial zeta foi aferido por eletroforese. Neste estudo foram testados dois nanossistemas, as nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) e nanocápsulas de núcleo lipídico revestida por quitosana (LNC-CS), em amostras comerciais de cinco touros. O efeito das nanocápsulas foi analisado em contato imediato (0 h) e após incubação por 1 h. Foram testadas cinco concentrações de nanocápsulas: 2,5%, 5%, 10%, 20% e 40% (v/v). Uma concentração adicional de 80% foi utilizada para os testes de motilidade. Dois grupos controles foram utilizados, substituindo as nanocápsulas com meio e com água, nas mesmas concentrações. A toxicidade foi avaliada através de alterações no padrão de movimentação dos espermatozoides por CASA, e a citometria celular por citometria de fluxo. Não houve diferença significativa entre os grupos incubados com LNC e LNC-CS e os grupos controles para concentrações de inferiores a 40%. Nos grupos de 40% houve diminuição da motilidade entre grupos experimentais e controle para o parâmetro DAP da análise por CASA nos dois períodos de incubação para os dois nanossistemas, e na integridade da membrana para ambos os tempos no grupo com LNC-CS. A atividade mitocondrial também foi reduzida para LNC-CS em tempo 0 h. Para concentração de 80% nos grupos encubados com LNC e LNC-CS houve redução nos parâmetros de motilidade, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF. Em conclusão, esse estudo demonstrou a reduzida toxicidade causada apenas em concentrações muito altas, viabilizando a utilização de LNC e LNC-CS como nanocarreador para células espermáticas.

**Palavras-chave:** Nanobiotecnologia, Citometria, Motilidade, Morfologia, Toxicologia.

## Abstract

DE CASTRO JORGE SILVA, Arthur. **Effect of lipid core nanocapsules with and without chitosan coating on bovine spermatozoa**. 2017. 62p. Dissertação de mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Nanobiotechnology is a rising area, with the continual advent of new systems to improve drug efficiency and therapies. Among the recently nanosystems developed, the lipid core nanocapsules stand out for the ability to carry different types of molecules in their nucleus or adhered to their surface. For nanosystems to be commercially employed, their animal and environmental and animal harmlessness must be proven. To address this emerging need, toxicology seeks the use of faster screening models, such as the use of male gametes and the evaluation of fertility parameters. The objective of this study was to evaluate the effect of two nanosystems of lipid core nanocapsules, composed of sorbitan monostearate, capric-caprylic triglycerides, polycaprolactone, lecithin and polysorbate, and the second one coated with chitosan, in bovine spermatozoa for evaluation of toxicity through sperm quality parameters. The evaluation of the profile and distribution of nanocapsule size was performed by laser diffraction and dynamic scattering of light, the zeta potential was measured by electrophoresis. In this study two nanosystems, lipid core nanocapsules (LNC) and chitosan-coated lipid core nanocapsules (LNC-CS) were tested commercial samples of five local bulls. The effect of the nanocapsules was analyzed in immediate contact (0 h) and after incubation for 1 h. Five concentrations of nanocapsules were tested: 2.5%, 5%, 10%, 20% and 40% (v / v). An additional concentration of 80% was used for the motility tests. Two control groups were used, replacing the nanocapsules with medium or water, with the same concentrations. Toxicity was assessed through changes in the sperm motility pattern by CASA, and cell cytometry by flow cytometry. There was no significant difference between the groups incubated with LNC and LNC-CS and the control groups at concentrations of less than 40%. In the 40% groups, there was decrease of motility between experimental groups and control for the DAP parameter of the CASA analysis in the two incubation periods for the two nanosystems, and in membrane integrity for both times in the group with LNC-CS. Mitochondrial activity was also reduced for LNC-CS in 0 h time. There was a reduction in the parameters of motility, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF, for 80% concentration in the groups incubated with LNC and LNC-CS. In conclusion, this study demonstrated the reduced toxicity caused only at very high concentrations, enabling the use of LNC and LNC-CS as a nanocarrier for sperm cells.

**Keywords:** Nanobiotechnology, cytometry, motility, morphology, toxicology.

## **Lista de Abreviaturas**

ALH - Amplitude of lateral head displacement (Amplitude do movimento lateral da cabeça)

AO - acridine Orange (Laranja de acridina)

BCF - Beat cross frequency (Frequência do batimento de cauda)

CASA - Computer-assisted sperm analysis (Análise de espermatozoides assistida por computador)

DAP - Distance average path (Distância média percorrida)

DCL - Distance curved line (Distância curvilínea)

DNA - Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

DSL - Distance straight line (Distância em linha reta)

FITC - Fluorescein isothiocyanate (Isotiocianato de fluoresceína)

LIN - Linearidade (Linearity)

LNC - Lipid-core nanocapsule (Nanocápsula de núcleo lipídico)

LNC-CS - Lipid-core nanocapsules chitosan coated (Nanocápsula de núcleo lipídico revestida por quitosana)

PCL - Poli ( $\epsilon$ -caprolactona)

PI - Propidium iodide (Iodeto de propídio)

PLA - Polylactic acid (Poliácido láctico)

PLGA - Poly lactic-co-glycolic acid (Poli ácido láctico-co-ácido glicólico)

PNA - Peanut agglutinin (Aglutinina de amendoim)

ROS - Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)

SiRNA - Small interfering RNA (Ácido ribonucleico de interferência curto)

SMGT - Sperm-mediated gene transfer (Transferência gênica mediada por espermatozoides)

STR - Straightness (Retilíneo)

VAP - Velocity average path (Velocidade média percorrida)

VCL - Velocity curved line (Velocidade curvilínea)

VSL - Velocity straight line (Velocidade em linha reta)

WOB - Wobble (Coeficiente de oscilação)

## Sumário

|                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL .....                                                                        | 11 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                                                                   | 14 |
| 2.1 Gametas masculinos, os espermatozoides .....                                                | 14 |
| 2.1.1 Morfologia e cinética dos espermatozoides .....                                           | 14 |
| 2.1.2 Parâmetros de qualidade espermática (cinética e integridade celular) .....                | 17 |
| 2.2 Nanocápsulas de Núcleo Lipídico (LNCs) .....                                                | 20 |
| 3 Objetivos do trabalho .....                                                                   | 24 |
| 3.1 Objetivo geral .....                                                                        | 24 |
| 3.1 Objetivos específicos .....                                                                 | 24 |
| 4 Artigo .....                                                                                  | 25 |
| 4.1 Manuscrito – Effects of chitosan-coated lipid-core nanocapsules on bovine sperm cells ..... | 25 |
| 5 CONCLUSÃO GERAL .....                                                                         | 53 |
| 7 REFERÊNCIAS .....                                                                             | 54 |

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

Nanotecnologia recebe contínuo estímulo na área de biotecnologia, principalmente para o aprimoramento de propriedades físico-químicas e para superar barreiras como a internalização celular e a especificidade de entrega de compostos diretamente para tecidos-alvos, como no *drug-delivery*. Diferentes tipos de nanopartículas, com amplo espectro de estrutura e composições, já foram desenvolvidas para poder articular o amplo espectro de fármacos e outros compostos já desenvolvidos (Khan et al., 2015). Dentre as diversas categorias de nanocápsulas disponíveis, as poliméricas demonstram diversas vantagens como estabilidade, aumento de interação com o tecido alvo e redução da toxicidade do soluto carregado (Frank et al., 2015). Em seu trabalho, Resnier e colaboradores carregaram Nanocápsulas de Núcleo Lipídico (LNC) com RNA de interferência curto (siRNA) para terapia gênica de melanomas com sucesso (Resnier et al., 2014). Diversos trabalhos utilizando compostos encapsulados por LNCs demonstraram o aumento do desempenho em relação aos mesmos compostos livres (Lucas et al., 2015; Remiao et al., 2016; Komninou, Remiao, et al., 2016; Schultze et al., 2014; Yurgel et al., 2014). E para reduzir a degradação das nanocápsulas e proporcionar maior compatibilidade química com a molécula transportada, é comum a adição de polímeros na superfície da nanocápsula (Mora-huertas et al., 2010; Frank et al., 2015).

Para a comercialização de novos produtos, as indústrias químicas e farmacêuticas devem primeiramente obter o registro para o devido produto, e para obtenção do registro algumas agências reguladoras ainda exigem estudos *in vivo* para validação de risco e toxicidade. Especialmente para indústrias que produzem na Europa ou exportam para aquele continente, devido a nova regulamentação adotada pela União Europeia, sob o nome de REACH (Registration, Evaluation and Authorization of Chemicals), há uma preocupação com o aumento do uso de animais para estudos toxicológicos (Williams et al., 2009; Lorenzetti et al., 2011). Portanto a validação de práticas *in vivo* já estabelecidas, e a obtenção de modelos adicionais inovadores se faz necessária, com alta capacidade preditiva de toxicidade, para tornar os processos de triagem mais eficientes e minimizar o uso extensivo de animais em estudos (Schenk et al., 2010; Freires et al., 2016). Criado pelo *6th European Framework Program*, o ReProTect é um projeto que desenvolveu métodos alternativos com o intuito de substituir ou reduzir o número de animais usados em pesquisas de

toxicologia reprodutiva, e os métodos recomendados – que empregam gametas como modelo *in vitro* – já são validados e aptos para uso (Schenk et al., 2010).

O lançamento do livro “Princípio das técnicas experimentais humanas” (The Principles of Humane Experimental Technique, Russel e Burch), que fundamentava a idéia dos 3 Rs da sustentabilidade: reduzir, refinar e substituir (do inglês replace, marcando o ano de 1959 como o primeiro passo na mudança do paradigma de uso de animais em pesquisa. O livro foi a concretização da linha de pensamento da época que se preocupava com o aumento crescente do uso de animais em pesquisas científicas, e buscava estabelecer práticas para proteger o bem-estar animal através da implementação de conceitos éticos durante o delineamento experimental dos projetos científicos (Russell WMS, 1992). A mudança nesse paradigma aconteceu lentamente na substituição do uso de animais por modelos experimentais *in vitro*. Fatores sociais e econômicos também contribuíram para a solidificação do novo paradigma, além da necessidade de modelos mais preditivos e similares ao objetivo do estudo, como o cultivo de células humanas (Zurlo, 2012).

Por conta da demanda por modelos alternativos para estudos toxicológicos, os espermatozoides receberam lugar de proeminência em estudos de fertilidade e reprodução, juntamente com os embriões. Espermatozoides, possuem o perfil biológico apto como modelo para estudos de triagem toxicológica, como o alto nível de condensação da cromatina e baixa atividade nuclear, aliado à capacidade da matriz celular espermática de monitorar a fragmentação de sua cromatina e conduzir a célula à apoptose (Gawecka et al., 2015; Ortega et al., 2011). Os parâmetros de qualidade espermática clássicos, utilizados em ensaios clínicos de fertilidade, como morfologia, motilidade e concentração, são sensíveis às alterações em seu entorno e já são usados como parâmetros de qualidade espermática e podem ser usados como ferramenta de predição de toxicidade (Cardoso et al., 2014; Mortimer, 1997; Marzec-Wróblewska et al., 2012; Harayashiki et al., 2013).

Estudos de toxicologia reprodutiva são distinguíveis de outros estudos toxicológicos devido à dificuldade de aferir profundamente o impacto de determinado tóxico, devido ao grande espectro da reprodução de efeitos que se inicia com a produção e maturação dos gametas nos órgãos reprodutivos, a fecundação, o desenvolvimento embrionário, e o período do pós-natal. Assim sendo, algumas das sequelas tornam-se detectáveis apenas na geração seguinte do organismo exposto, ou na geração seguinte (Spielmann, 2009). No entanto, esse tipo de estudo segue

como o mais indicado para testes iniciais devido à sua rapidez e precisão em detecção de toxicidade (Schenk et al., 2010; Lorenzetti et al., 2011; Lazzari et al., 2008)

A diminuição da maquinaria celular e a perda da capacidade de transcrição de seu material genético (Agarwal et al., 2016) permitem que o espermatozoide funcione como instrumento para transgênese, através da técnica denominada SMGT (Sperm Mediated Gene Transfer) (Rieth et al., 2000). Com o intuito de aprimorar a técnica de SMGT, aumentando sua eficiência, novas metodologias utilizando o auxílio da nanotecnologia foram descritas (Vinicius Farias Campos et al., 2011; V. F. Campos et al., 2011).

Portanto, o objetivo do trabalho aqui exposto foi de testar o efeito de duas nanocápsulas de núcleo lipídico, com e sem o revestimento de quitosana na superfície, sobre a motilidade, morfologia e integridade das organelas de células espermáticas bovinas, para utilização posterior das LNCs como carreadoras de moléculas diversas e para comprovação da inocuidade dessas nanocápsulas em diferentes células e tecidos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Gametas masculinos, os espermatozoides

Observado pela primeira vez em 1677, através de um microscópio rudimentar e artesanal, o espermatozoide e sua movimentação foram descritos com imensa acurácia por Antonie van Leeuwenhoek. A hipótese de que os espermatozoides possuíam envolvimento no desenvolvimento do óvulo só veio a ser comprovada por Oscar Hertwig em 1875 (Fawcett, 1975). A descoberta deu origem aos estudos de reprodução, palavra que só foi introduzida em 1749 por Georges-Louis Leclerc, conde de Buffon, durante o período naturalista. Até então, havia um grande debate entre “ovistas” e “espermatozoidistas”, sobre qual destes possuía papel principal no desenvolvimento do feto. A contenda começou com Leeuwenhoek, que ao apreciar os espermatozoides em seu microscópio chamou-os de homúnculos. E ao observar o líquido seminal, se deparou com o que chamou de “pequenas veias”, e sugeriu a hipótese de que o homem era totalmente responsável pela geração do feto, cabendo à mulher apenas receber o sêmen e nutri-lo. A disputa viu o início de seu fim com a teoria de Matthias Jakob Schleiden e Theodor Schwann, chamada a teoria das células, do alemão *Zelltheorie*, que explicava porque espermatozoide e oócito eram equivalentes apesar de suas diferenças discrepantes (Cobb, 2012).

#### 2.1.1 Morfologia e cinética dos espermatozoides

Em mamíferos, ainda no período de desenvolvimento embrionário do macho, as células germinativas primordiais migram para o testículo e tornam-se espermatogônias, ou células germinativas imaturas, fixadas nas camadas interiores dos túbulos seminíferos. No período de puberdade as espermatogônias e as células de *Sertoli* migram em sentido ao lúmen do tecido. As espermatogônias, sob controle hormonal da glândula pituitária, sofrem divisão mitótica tornando-se espermatócitos primários, após o processo de Meiose I dividem-se em espermatócitos secundários e então espermatídes, após a meiose II. Por fim, as espermatídes são sujeitas à espermiogênese, dando origem ao espermatozoide (Hall & Guyton, 2011).

O sêmen, produto final do ejaculado, é composto pelos espermatozoides e os fluídos seminais, produzido pelas vesículas seminais e a próstata. A maturação do

espermatozoide ocorre no epidídimo, ao encontrar-se com as secreções ali presentes, ricas em nutrientes. Outros secreções de órgãos como o ducto deferente, a vesícula seminal, a próstata e a glândula bulbouretral também possuem nutrientes e outras substâncias capazes de maturar e nutrir os espermatozoides para a ejaculação (Wein et al., 2012; Puppo & Puppo, 2016; Masters & Johnson, 1966; Owen & Katz, 2005).

Há um desentendimento acerca da anatomia dos espermatozoides e suas regiões. Existem duas opiniões sobre a divisão das peças que compõem o espermatozoide. A menos comum divide a célula espermática em três regiões: cabeça, peça intermediária e cauda. No entanto, há lógica ao se dividir em apenas duas regiões: Cabeça e cauda, visto que a movimentação flagelar se inicia próximo a cabeça e que a peça intermediária e o prolongamento da cauda são apenas especializações da mesma região (Fawcett, 1965). Neste trabalho utilizaremos a divisão em duas partes.

A cabeça das células espermáticas é onde encontra-se o envelope nuclear circundando a cromatina haploide altamente condensada, envoltos por um citoplasma fino e ausente de outras organelas. No sentido oposto ao flagelo, envolvendo a membrana celular e ocupando dois terços da área da cabeça situa-se o acrossoma. Formado principalmente pelo Complexo de Golgi, essa especialização única às células espermáticas detém diversas enzimas, como a hialuronidase. Essas enzimas possuem papel notório no processo de fecundação. A região da cauda inicia-se pelo entroncamento, região que une a cabeça à peça intermediária. A peça intermediária e o restante da cauda são estruturadas pelo complexo de filamento axial, ou axonema, que é um conjunto de 11 microtúbulos. Dois na região central, circundados por 9 microtúbulos compostos de duas subunidades equidistantes do par central. Na peça intermediária os feixes de microtúbulos do axonema são envoltos por mitocôndrias, fornecendo energia para a movimentação do flagelo. O axonema e a peça intermediária são encobertos por uma fina membrana celular (Fawcett, 1975; Hall & Guyton, 2011).

Levando em conta características individuais de cada célula, a morfologia avalia parâmetros morfométricos do espermatozoide (Chemes & Rawe, 2003). A morfologia das células espermáticas varia de acordo com cada espécie. A diferença entre um espermatozoide bovino, suíno, humano ou murinho é perceptível sob análise em microscópio comum. E mesmo comparando células da mesma espécie as métricas podem ser discrepantes devido às anormalidades morfológicas. Levando em

conta que o formato da cabeça do espermatozoide é resultante do formato do núcleo contido nela, podemos dizer que cada espermatozoide difere levemente entre si (Arruda et al., 2015; Fawcett, 1965). Portanto, a morfologia é tida como um parâmetro de qualidade espermática muito importante para avaliar a fertilidade, que diferentemente de outras análises capazes de diagnosticar uma causa específica, os ensaios de morfologia apontam apenas para quadros gerais de alterações ambientais (Menkveld et al., 2011).

Muitas das características morfológicas espermáticas podem ser analisadas rapidamente e em grande quantidade por citometria de fluxo. A grande diversidade de fluorocromos e sondas fluorimétricas tornam a citometria mais proeminente entre os testes de fertilidade. Podendo determinar o status do DNA e da cromatina espermática, fragmentação de DNA, viabilidade celular, atividade mitocondrial e apoptose, dentre muitas outras possibilidades (Gillan et al., 2005; Martínez-Pastor et al., 2010).

Morfologia não é o único parâmetro usado na determinação da qualidade espermática ou na predição de fertilidade, a movimentação do espermatozoide, ou motilidade, decorrente de seu movimento flagelar é utilizado rotineiramente em laboratórios de reprodução animal. A motilidade é um dos critérios mais importantes na avaliação da fertilidade, mas apesar da sua relevância ainda é um diagnóstico idiopático na maioria dos casos, ou de pouca evidência para a verdadeira causa (Mortimer et al., 2015; Turner, 2006). No entanto, a análise da motilidade já demonstrou ser significativa ao determinar a capacidade dos espermatozoides de realizar a fecundação tanto *in vitro* como *in vivo*, podendo servir como modelo de predição de fertilidade *in vivo* com estudos *in vitro* (Mortimer, 1997; Mayevsky et al., 1983). Dessa forma, a capacidade motora dos espermatozoides possui potencial como parâmetro toxicológico, por ser altamente susceptível a alterações externas (Lopes et al., 2014; Harayashiki et al., 2013).

Diferenças na motilidade espermática são resultado de alterações bioquímicas, e mutações genéticas que podem ter acarretado em disfunções anatômicas do espermatozoide, portanto dentro de uma população de células espermáticas é comum encontrar subpopulações com motilidades distintas, tornando os espermatozoides um grupo heterogêneo, e a análise das subpopulações pode auxiliar a análise de fertilidade (Martínez-Pastor et al., 2011; Chantler et al., 2004; Katz & Davis, 1986; Katz et al., 1979). Padrões de motilidade distintos podem ocorrer sob

circunstancias que acarretem na hiperativação do espermatozoide. No epidídimo os espermatozoides estão inativos ou com motilidade muito baixa, ao entrar em contato com o plasma seminal, ou meio fisiológico *in vitro*, o espermatozoide passa a apresentar movimentação vigorosa e em linha reta. Ao aproximar-se do oócito ou ambiente semelhante às tubas uterinas, o espermatozoide adquire características da hiperativação, que é o aumento da amplitude do movimento flagelar, e a mudança da movimentação linear para movimentos assimétricos ou lineares. A hiperativação auxilia a penetração de mucosa e da zona pelúcida (Yanagimachi, 1994; Stauss et al., 1995; Suarez & Ho, 2003). Portanto, a avaliação da motilidade de um determinado sêmen deve levar em conta a hiperativação, comparando com o próprio sêmen, e a heterogeneidade da amostra (Ho & Suarez, 2001).

### **2.1.2 Parâmetros de qualidade espermática (cinética e integridade celular)**

A determinação de parâmetros morfológicos pode ser realizada através de ensaios de citometria de fluxo. O citômetro de fluxo é um aparelho capaz de aferir propriedades físicas e colorimétricas ou fluorescentes de partículas celulares ou células inteiras em fluxo. O objeto sob análise, em fluxo laminar, percorre um ou diversos pontos de iluminação possibilitando a análise de dispersão de luz, absorbância e fluorescência. A popularização dos citômetros, mesmo que reduzida em países em desenvolvimento, tornou a técnica rotineira em alguns laboratórios de reprodução, e com o desenvolvimento contínuo de novos corantes a variedade de funcionalidades é crescente. (Silva & Gadella, 2006; Hossain et al., 2011). Em seguida alguns dos corantes utilizados neste trabalho.

A rodamina é um corante similar às pironinas, levemente alcalina e com intensidade de coloração fraca (Liisberg, 1968). O corante rodamina já é extensivamente usado em pesquisas, principalmente como marcador de internalização celular, geralmente conjugada à molécula de interesse. Na maioria dos estudos a Rodamina B demonstrou-se eficiente no acompanhamento das moléculas e estruturas de interesse e sua internalização pelas células, em alguns casos foi capaz de apontar o sítio específico de acúmulo intracelular. O método de quantificação da intensidade luminosa do corante pode ser feita por citometria ou análise em microscópio de fluorescência (Botella et al., 2016; Enciso et al., 2012; Morimoto et al., 2016; Miyaki et al., 2012; Liisberg, 1968).

A detecção de DNA condensado é essencial para estudos de viabilidade celular, e Hoechst 33342 permite essa análise, por ser um corante fluorescente, permeável às membranas plasmática e nuclear, que se liga ao DNA e emite pouca fluorescência caso não ocorra a ligação (Hinkley et al., 1986; Green, 1992). Hoechst, ao se ligar ao DNA, torna possível a avaliação do estado da célula. Células apoptóticas apresentam DNA condensado, ao contrário de células necróticas ou saudáveis. O corante possui coloração azul e no caso dos espermatozoides, que possuem cromatina condensada naturalmente, pode ser usada em conjunto com outros corantes para avaliar o status celular (Crowley et al., 2016; Farrell et al., 1996). No entanto o corante por si só pode ser capaz de causar toxicidade e levar a célula à apoptose. Sua toxicidade deve ser levada em conta na hora de avaliar um grupo celular corado (Zheng et al., 2016).

A reação do acrossoma é vital para a penetração do espermatozoide no oócito e, portanto, a avaliação da integridade do acrossoma está diretamente ligada com a fertilidade (Miyazaki et al., 1990). A estrutura do acrossoma em diferentes mamíferos apresenta a capacidade de se ligar à muitas lectinas. No entanto a lectina de *Arachis hypogaea* (PNA), o amendoim, apresenta a capacidade de se ligar exclusivamente ao acrossoma (Jones et al., 1988). Lectinas são glicoproteínas encontradas em plantas e animais e são capazes de se ligarem exclusivamente a regiões específicas de carboidratos, conferindo o alto potencial como sonda para uso em histoquímica e imunohistoquímica (Cooper, 1984). A lectina por si não emite fluorescência e não pode ser detectada por citometria ou microscopia a menos que conjugada com um outro fluorescente ou corante, como costuma ocorrer nos ensaios de integridade acromossomal (Sutovsky et al., 2015; Odhiambo et al., 2011; Peláez & Long, 2007; Partyka et al., 2010). Isotiocianato de fluoresceína (FITC) é um corante estável e capaz de se ligar fortemente a anticorpos e outras moléculas, com ótimo potencial como ferramenta para histoquímica e imunohistoquímica (Marshall et al., 1958). Em estudos anteriores, FITC foi conjugado com a lectina PNA e com anticorpo monoclonal para dar fluorescência à essas moléculas usadas como sonda, mas que não possuem fluorescência (D'Cruz & Haas, 1996; Lybaert et al., 2009).

Iodeto de propídio (PI) é um análogo de brometo de etídeo, e igualmente capaz de corar DNA e incapaz de penetrar a membrana de células vivas. Portanto sua coloração ocorre principalmente em células necrosadas ou em estágio avançado de apoptose. O emprego de PI, sem a adição ribonucleases, leva à complexação de PI

com DNA mitocondrial e ribossomos (Ockleford et al., 1981; Krishan, 1975). O iodeto de propídio é comumente usado em associação com outros corantes para detecção da integridade de membrana, e consequentemente a viabilidade celular (Niu et al., 2011; Pintado et al., 2000; Yaniz et al., 2013).

Para os espermatozoides a peroxidação lipídica causada pelo excesso de espécies reativas de oxigênio (ROS) causa dano à membrana celular, causando sua saturação, redução da permeabilidade e consequentemente, diminuindo seu metabolismo energético (Drummen et al., 2002; Brouwers et al., 2017; Domínguez-Rebolledo et al., 2010; Ortega Ferrusola et al., 2009). Bodipy C11581/591 é um corante sensível à oxidação. A emissão de fluorescência no estado não oxidado é vermelha (591 nm) e verde após oxidação (510 nm). Sua aplicação como sonda se fundamenta na sua sensibilidade à oxidação, funcionando como agente redutor na ausência de antioxidantes (Pap et al., 1999).

Através do ensaio de estrutura da cromatina espermática (SCSA), o laranja de acridina (AO) é capaz de aferir o dano não reparado do DNA de espermatozoides. O dano ao DNA espermático está ligado a diminuição de fertilidade, perda de embriões e aborto (Evenson & Wixon, 2006; M J D'Occhio et al., 2007; M. J. D'Occhio et al., 2007; Evenson et al., 1980). Laranja de acridina é fluorescente e se liga ao DNA de fita dupla emitindo cor verde. Ao ser exposta ao laser com comprimento de onda de 488 nm a molécula colapsa e passa a emitir fluorescência vermelha, ligando-se à fitas simples de DNA (Evenson & Wixon, 2005).

Assim como a citometria de fluxo é o modo automatizado de avaliação da integridade celular e morfologia, a análise espermática assistida por computador (CASA) é a automatização da aferição das características cinéticas dos espermatozoides. Todos os sistemas de CASA são o conjunto do microscópio, câmera e computador que gravarão a movimentação do espermatozoide em vídeo e então calcularam a movimentação dos espermatozoides de acordo com o caminho percorrido em um determinado tempo. A análise ocorre entre cada quadro (*frame*) do vídeo, e a soma do caminho percorrido e a linearidade são aferidos. Alguns instrumentos mais recentes são capazes de calcular também a frequência de batimentos flagelar, seja pela captação direta da do flagelo ou pela movimentação angular da cabeça do espermatozoide (Kruger, 1995; Kime et al., 2001; Rijsselaere et al., 2012; Amann & Waberski, 2014). A maioria dos aparelhos para execução da CASA incluem o software para realização dos cálculos, no entanto uma iniciativa

independente busca a validação de um software livre e com código aberto para a popularização da CASA (Wilson-Leedy & Ingermann, 2007).

O sistema de CASA utiliza todos os dados gerados através da análise da movimentação dos espermatozoides e calcula o número de espécimes móveis (motilidade), espécimes móveis com deslocamento espacial significativo (motilidade progressiva), velocidade curvilínea, velocidade média do trajeto, velocidade em linha reta, amplitude do deslocamento lateral da cabeça, linearidade do caminho curvilíneo, retidão média, e frequência do batimento cruzado. O padrão cinético dos espermatozoides são indicativos de capacitação, hiperativação e fertilidade, parâmetros chaves na qualidade espermática (Amann & Waberski, 2014). Alguns dos parâmetros utilizados

Os parâmetros avaliados por, CASA e disponíveis após a análise, são: DAP – distancia média percorrida (distance average path), DCL – distancia curvilínea (distance curved line), DSL – distancia em linha reta (distance straight line), VAP – velocidade média percorrida (velocity average path), VCL – velocidade curvilínea (velocity curved line), VSL – velocidade em linha reta (velocity straight line), STR – retilíneo (straightness,  $VSL/VAP$ ), LIN - linearidade (linearity,  $VSL/VCL$ ), WOB – coeficiente de oscilação (wobble,  $VAP/VCL$ ), ALH – amplitude do movimento lateral da cabeça (amplitude of lateral head displacement), BCF – frequência do batimento de cauda (beat cross frequency) (Almeida, 2014). Alguns estudos se contradizem à respeito de quais parâmetros estão mais ou menos relacionados à fertilidade, no entanto o ALH (Freour et al., 2010) e o VCL (Larsen et al., 2000) apresentam maior proeminência nos estudos de avaliação dos parâmetros.

## **2.2 Nanocápsulas de Núcleo Lipídico (LNCs)**

Nanocápsulas poliméricas são nanopartículas com a característica de possuírem uma cavidade interna para transporte de droga, como em um sistema vesicular, revestida pela membrana polimérica (Micheli et al., 2012; Soppimath et al., 2001). As nanocápsulas podem conter água ou óleo em seu núcleo, no último caso pode ser um lipídio em estado líquido ou uma mistura coloidal de lipídio líquido e lipídio sólido (organogel). Neste caso as nanocápsulas são chamadas de nanocápsulas de núcleo lipídico e são compostas por polímero, óleo, tensioativo e água (Frank et al., 2015). A escolha do polímero a ser usado como membrana da nanocápsula e sua

densidade são escolhas fundamentais por controlarem a liberação da droga internalizada para o ambiente, e quanto maior a concentração de polímero, menor a liberação (Poletto et al., 2008). Os principais polímeros empregados como membrana são poli ( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), poliácido láctico (PLA), e poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). Seis métodos podem ser utilizados para a produção de nanocápsulas: Deposição interfacial de polímero pré-formado ou automontagem, revestimento com polímero, camada por camada, emulsão-difusão, emulsificação dupla, coacervação em emulsão (Frank et al., 2015).

A escolha dos materiais a serem usados como polímero, organogel e surfactante, juntamente com o processo de produção das nanocápsulas possuem grande importância para as propriedades físico-químicas e biológicas da nanocápsula (Frank et al., 2015). As propriedades físico-químicas finais são fundamentais para conhecer a qualidade e a estabilidade da nanocápsula. As avaliações principais e mais frequentes das propriedades são o tamanho da partícula, e o potencial zeta, a eficiência de encapsulamento e o padrão de liberação da droga internalizada são pontos importantes para análise (Fang et al., 2013).

O tamanho médio das partículas é determinado por espectroscopia de correlação de fótons, também chamado de espalhamento dinâmico de luz, e difração à laser. A técnica de espectroscopia afere a intensidade da luz espalhada pela movimentação das partículas, a difração à laser, por sua vez, mede o tamanho das partículas pelo ângulo de difração, que é inversamente proporcional ao tamanho da partícula (Fang et al., 2013; Carmona-Ribeiro, 2010). As nanocápsulas possuem diâmetro menor que 1  $\mu\text{m}$  com baixa variação de tamanho, nanocápsulas com tamanho inferior a 50 nm tendem a desaparecer rapidamente de sistemas orgânicos comparadas às nanocápsulas com tamanho médio próximo a 100 nm (Hirsjärvi et al., 2013).

O potencial zeta é a carga da superfície de cada molécula de um sistema coloidal. O potencial zeta influencia diretamente na estabilidade das nanocápsulas. Repulsão eletrostática causada pela carga na superfície das nanocápsulas, evita a fusão das mesmas (Fang et al., 2013). A carga da nanocápsula é dada pelo polímero da membrana, o surfactante utilizado, e o pH do meio. A carga da nanocápsula pode influenciar também a ligação com a célula-alvo (Poletto et al., 2008; Mora-Huertas et al., 2010).

Modificações superficiais podem ser feitas para alterar a carga da molécula e aumentar a afinidade o tecido ou célula desejados, diminuir a opsonização e fagocitose por macrófagos (Vonarbourg et al., 2006; Mayer, 2005), poli(etileno glicol) (PEG) e metoxi poli(etileno glicol) estão entre alguns dos funcionalizantes mais utilizados (Bender et al., 2012). Polisorbato 80, um emulsificante e tensioativo, foi empregado com sucesso em nanocápsulas na entrega de drogas em tecido específico (Bernardi et al., 2009; Frozza et al., 2010). A funcionalização pode ser conceituada como a aplicação de um ligante, seja ele um carboidrato, glicoproteína, peptídeo ou anticorpo, para direcionar a nanocápsula contendo a droga em estudo para um tecido específico (Jolck et al., 2011). O revestimento pode ocorrer para alterar a carga da nanoestrutura, ou permitir interações celulares mais eficientes, tornando-a biocompatível. A quitosana, um polissacarídeo catiônico atóxico, é um bom candidato. Sua estrutura torna-o muco aderente e hemocompatível, características desejáveis no desenvolvimento de nanoestruturas (Oyarzun-Ampuero et al., 2010; Xu et al., 2010; Bender et al., 2012).

A busca por inovação e inspiração são parte da natureza do pesquisador. Por esse motivo era previsível que a nanotecnologia seria englobada pela biotecnologia, formando a nanobiotecnologia (Khan et al., 2015). E se há conhecimento e recurso, por que não utiliza-los a favor da ciência e da sociedade? Com esse intuito é que o nosso grupo de pesquisa, no passado, uniu a nanobiotecnologia com a reprodução. Campos et al (2011a; 2012b) utilizou nanopolímeros para inserir DNA exógeno em espermatozoides, sem diminuir a fertilidade do sêmen. Dando sequência a seu trabalho, os espermatozoides contendo sêmen exógeno fertilizaram oócitos *in vivo* gerando embriões viáveis, em uma técnica batizada de NanoSMGT. A metodologia desenvolvida demonstrou resultados satisfatórios na internalização de DNA exógeno para os espermatozoides e na geração de embriões com o transgene intacto. No entanto a eficiência da técnica segue em padrões indesejáveis. Na busca de ferramentas que possam aumentar a eficiência da técnica novos nanossistemas devem ser buscados. E para que estes possam ser implementados, a toxicidade das moléculas deve ser avaliada. Alguns trabalhos do grupo utilizando as nanocápsulas incluem a utilização de melatonina encapsulada em LNC melhora o processo de maturação de embriões de maneira superior à melatonina encapsulada por nanocápsulas poliméricas ou de forma livre (Remião et al., 2016; Komninou, Remião, et al., 2016); tretinoína nanoencapsulada em LNC promove a melhora na produção *in*

*vitro* de embriões do que sua forma não encapsulado (Lucas et al., 2015), e também é capaz de superar a resistência celular de linhagens de adenocarcinoma induzindo à apoptose e redução da viabilidade celular (Schultze et al., 2014); um derivado de Metotrexato encapsulado em LNC foi mais eficiente do que o antimetabólito em solução (Yurgel et al., 2014)

### **3 OBJETIVOS DO TRABALHO**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito tóxico das nanocápsulas de núcleo lipídico na qualidade de espermatozoides bovinos através da avaliação de parâmetros de fertilidade e qualidade espermática.

#### **3.1 Objetivos específicos**

1. Aferir o efeito da incubação dos dois modelos de nanocápsulas (com e sem revestimento de quitosana) no padrão cinético dos espermatozoides através de avaliação por CASA, pelos parâmetros de motilidade, motilidade progressiva, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB, ALH, BCF.
2. Acompanhar as perturbações morfológicas nas células espermáticas causadas pelas nanocápsulas, afim de detalhar possíveis interações estruturais entre nanocápsula e espermatozoide, afim de buscar quaisquer sinais de toxicidade pela avaliação da integridade de membrana, integridade do acrossoma, atividade mitocondrial, peroxidação lipídica e dano ao DNA espermático.

## **4 ARTIGO**

### **4.1 Manuscrito – Effects of chitosan-coated lipid-core nanocapsules on bovine sperm cells**

Artigo/Manuscrito publicado na revista *Toxicology In Vitro* em abril de 2017.

## Effects of chitosan-coated lipid-core nanocapsules on bovine sperm cells

Arthur de Castro Jorge Silva<sup>a</sup>, Mariana Härter Remirão<sup>a</sup>, Caroline Gomes Lucas<sup>a</sup>, William Borges Domingues<sup>a</sup>, Tony Silveira<sup>a</sup>, Julia Dame Paschoal<sup>a</sup>, Denise S. Jornada<sup>b</sup>, Carine Dahl Corcine<sup>c</sup>, Antonio Sergio Varela Junior<sup>d</sup>, Willian A. Prado<sup>e</sup>, Vinicius Farias Campos<sup>a</sup>, Fabiana Kömmling Seixas<sup>a</sup>, Silvia S. Guterres<sup>b</sup>, Adriana R. Pohlmann<sup>b,e</sup>, Tiago Collares<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 96010-610, RS, Brazil;*

<sup>b</sup> *Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, Porto Alegre, 90610-000, RS, Brazil;*

<sup>c</sup> *Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas; Pelotas, 96010-610, RS, Brazil;*

<sup>d</sup> *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 96201-900, RS, Brazil*

<sup>e</sup> *Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre, 91501-970, RS, Brazil*

\* Corresponding author:

Tiago Collares, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brazil, Cep: 96010-900. RS, Brazil; E-mail: collares.t@gmail.com; Phone number: +555332757350;

Conflict of Interest statement:

The authors declare that there are no conflicts of interest

## **ABSTRACT**

Toxicology studies have a pivotal role for selection of new nanosystems. As lipid-core nanocapsules (LNC) rise as a potential system not only for drug delivery but also for immunotherapy and gene therapy, the demand for models of toxic screening increases, and sperm arises as a promising model due to the easiness to evaluate its viability parameters. LNCs were coated with chitosan, chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS), in order to modify the nanocapsule surface. We evaluated the toxicity of LNC and LNC-CS after incubation with bovine sperm in different concentrations (2.5%, 5%, 10%, 20%, 40% and 80% (v/v) and periods of exposure (0h and 1h). CASA parameters and flow cytometry assays were performed to assess LNC and LNC-CS effects. The results corroborated with previous studies indicating that there is no toxicity from LNCs and LNC-CS below 40% (v/v) concentration.

Keywords: Nanosystem; Nanocapsules; Chitosan; Sperm; Spermtotoxicology.

## **1. INTRODUCTION**

In the last decade, nanotechnology has played a prominent role in medicine due to its potential to produce new and more efficient tools for diagnosis, therapies and treatment of diseases (Mahapatro and Singh, 2011; Mora-huertas et al., 2010). Nanocapsules, regardless their composition, have been extensively used as a delivery system for a more efficient or site-specific molecule distribution, improving the solubility of insoluble or poorly soluble drugs (Dobrovolskaia et al., 2009; Schaffazick et al., 2005) and reducing the toxic effects. Recently, one type of polymeric nanocapsules, the lipid-core nanocapsules (LNC), has received increased attention due its great potential to drug delivery in different tissues (Oliveira et al., 2014).

LNC are core-shell structures, with an oily core surrounded by a polymeric wall, in which the oily core is formed by sorbitan monostearate and capric-caprylic triglyceride, structured as an organogel (Durli et al., 2013). Applications of LNC range from drug delivery, cancer immunotherapy and gene therapy (Pohlmann et al., 2013), in addition to the great cell uptake capacity of these nanocapsules (Fiel et al., 2014). In gene therapy, cationic polymers have been employed to modify the nanocapsules surface. The biodegradable, biocompatible, non-toxic and mucoadhesive polysaccharide extracted from crustacean shells, known as chitosan, has been one of the most promising material for nanocapsules development including a surface-coating on LNC due to its ability of binding covalently to DNA (Bender et al., 2012; Siqueira et al., 2011). Our group has successfully enhanced bovine oocyte maturation and embryonic development by supplementing the maturation medium with tretinoin-loaded and melatonin-loaded lipid-core (Komninou et al., 2016; Lucas et al., 2015; Remião et al., 2016). Furthermore, we previously determined that LNC and chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS) are human blood compatible (Bender et al., 2012).

Following the 3Rs principle (refinement, reduction, replacement) alternative toxicity screening strategies which provide the reduction in animal use have been developed and validated (Beker et al., 2012; Scholz and Genschow, 1999; Tessaro et al., 2015). Under the EU Integrated Project ReProTect (6th Framework Programme) (<http://www.reprotect.eu>; (Lorenzetti et al., 2011) a battery of *in vitro* tests have been implemented to study the reproductive toxicity. Some *in vitro* tests, such as the bovine oocyte maturation assay (bIVM) and the bovine *in vitro* fertilization assay (bIVF) were validated (Lazzari et al., 2008; Lorenzetti et al., 2011; Tessaro et al., 2015). As oocytes and embryos, the mammalian spermatozoa has been used efficiently as a biosensor for environmental and toxicological insults (Andersson et al., 2009; Mikkola et al., 2007; Peltola et al., 2004). Sperm parameters are required for the male reproductive success as egg penetration and fertilization. Any damage to the sperm motility,

plasma membrane and DNA integrity could impair its reproductive capability (García-Vázquez et al., 2009).

Considering that lipid-core nanocapsules are promising intracellular carriers, the current study has investigated the action of LNC and LNC-CS on bovine sperm cells. The toxicity of different LNC and LNC-CS concentrations on sperm kinetics, membrane and acrosome integrity, mitochondrial activity, lipid peroxidation and DNA damage are examined.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### *2.1 LNCs synthesis*

#### *2.1.1 LNC and LNC-CS*

The lipid-core nanocapsules in aqueous dispersion were prepared by a self-assembling mechanism. An organic phase (containing 25 mL of acetone, 0.038 g of sorbitan monostearate, 0.160 mL of capric-caprylic triglyceride and 0.100 g of PCL) was added to a lecithin solution in ethanol (0.600 g in 5 mL) under magnetic stirring at 40 °C. The organic phase was injected in an aqueous phase (50 mL of water and 0.077 g of polysorbate 80). After 10 min at 40 °C, the organic solvent was eliminated and water partially evaporated under reduced pressure (at 40 °C) to a final volume of 10 mL. This formulation was named LNC.

Regarding the cationic coating, 1 mL of 1% chitosan in 1% acetic acid aqueous solution was added (dropwise) to 9 mL of LNC. Thus, the formulation was stirred for 2 h to ensure complete interfacial reaction. This formulation was defined as LNC-CS.

#### *2.1.2 Fluorescent-labeled LNC and LNC-CS*

To obtain fluorescent-labeled LNC and LNC-CS, the same methodology above was used replacing 10% of polymer by rhodamine B-PCL conjugate. The rhodamine B was covalently bound to the hydroxyl end-groups of poly( $\epsilon$ -caprolactone) under inert atmosphere

(argon) using carbodiimide as activating agent for the carboxylic acid conversion to ester (Weiss-angeli et al., 2012).

## *2.2 Physic-chemical characterization*

### *2.2.1 Laser Diffraction*

Laser diffraction analysis was carried out using a Mastersizer<sup>®</sup> 2000 instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK). Approximately 300  $\mu\text{L}$  of each sample was added in the dispersion accessory (Hydro 2000SM Dispersion Unit) containing about 100 mL of distilled water (necessary to obtain obscuration levels between 2% and 8%). Background signal (distilled water) was measured before each analysis. For rhodamine B-labeled formulations (RhoB-LNC-CS and RhoB-LNC) the blue laser was turned off to avoid interference by molecular photon absorption.

### *2.2.2 Photon Correlation Spectroscopy*

Photon correlation spectroscopy (or dynamic light scattering) analysis was performed in a ZetasizerNano ZS model ZEN 3600 instrument (Malvern Instruments, Malvern, UK). The formulations were diluted 500 times in pre-filtered ultrapure water (Millipore<sup>®</sup>, 0.45  $\mu\text{m}$ ).

### *2.2.3 Zeta potential*

The zeta potential was evaluated by electrophoresis mobility in a ZetasizerNano ZS model ZEN 3600 (Malvern Instruments, Malvern, UK). The samples were diluted 500 times in 0.5  $\text{mmol mL}^{-1}$  NaCl aqueous solution (pre-filtered through 0.45  $\mu\text{m}$  filter, Millipore<sup>®</sup>).

## *2.3 Semen processing and experimental design*

Frozen semen straws from five bulls were thawed in a water bath at 35 °C for 30 s and separately suspended in 2 mL of Opti-MEM I medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The samples were centrifuged twice for 5 min at 200 ×g to remove cryoprotectants from media. An aliquot of  $25 \times 10^4$  sperm/mL from the pellet was added in each treatment and used in subsequent analysis.

To sperm kinetics analysis the samples from each bull were incubated with five concentrations of both LNC and LNC-CS: 2.5%, 5%, 10%, 20%, 40% and 80% (v/v). Spermatozoa were analyzed immediately after incubation (time 0h) and after 1h exposition (time 1h). Two control groups, named M control, containing sperm suspended in medium, and W control, containing sperm suspended in water at 40% concentration were used. Incubation and analysis were performed in three independent replicates.

To examine the toxicity of different LNC and LNC-CS concentrations on membrane and acrosome integrity, mitochondrial activity, lipid peroxidation and DNA damage, samples were incubated with three concentrations of both LNC and LNC-CS: 10%, 20% and 40% (v/v). Spermatozoa were analyzed immediately after incubation (time 0h) and after 1h exposition (time 1h). Only the M control was used for these analysis.

To evaluate LNC and LNC-CS incorporation in sperm cells, RhoB-LNC-CS and RhoB-LNC nanocapsules were used for incubation of spermatozoa in all concentrations (2.5%, 5%, 10%, 20%, 40% and 80% (v/v)), at 0 and 1 hours. The incorporation was analyzed by flow cytometry and images were taken by confocal microscopy.

#### *2.4 Sperm kinetics analysis*

The sperm samples exposed by the different treatments were prepared in slides and analyzed by computer-assisted sperm analysis (AndroVision®, Minitube, Germany). To perform the evaluations, ten microscopic fields of each slide was recorded and investigated.

The following parameters were analyzed: Total motility (%), progressive motility (%), distance average path (DAP,  $\mu\text{m}$ ), distance curved line (DCL,  $\mu\text{m}$ ), distance straight line (DSL,  $\mu\text{m}$ ), velocity average path (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), velocity curved line (VCL,  $\mu\text{m/s}$ ), velocity straight line (VSL,  $\mu\text{m/s}$ ), straightness [STR (VSL/VAP), %], linearity [LIN (VSL/VCL), %], wobble [WOB (VAP/VCL), %], amplitude of lateral head displacement (ALH,  $\mu\text{m}$ ), and beat cross frequency (BCF, Hz).

## 2.5 Cytometry analysis

In regard to flow cytometry analysis, Attune Acoustic Focusing Cytometer<sup>®</sup> (Applied Biosystems, California, USA) was used. The samples were exposed to Hoechst 33342 (H33342, 14533, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in concentration of 2 mM, 5 min before each analysis. The events were detected by fluorochrome with photomultiplier (Photomultiplier - PMT) VL1 (filter 450/40); except in DNA fragmentation analysis, when H33342 was not used. The green, orange and red fluorescences were analyzed by PMTs BL1 (530/30 filter), BL2 (575/24 filter) and BL3 (filter > 640) filters, respectively. Cytometer fluorescence stability was tested daily using standard beads (Invitrogen, Carlsbad, California, USA). The acquisition rate was 200 events/second totaling 20,000 events per sperm sample. All assays were done in three independent replicates. The results were analyzed using the *Attune Cytometric Software V2.1*. The non-sperm events from analysis by scatter plots of FSC x SSC (Petrunkina et al., 2005) and negative fluorescence of H33342 events (debris) were eliminated.

### 2.5.1 LNCs incorporation assay

The incorporation analysis of different concentrations of LNC and LNC-CS were implemented through RhoB-LNC and RhoB-LNC-CS. The sperm cells were classified as incorporated with LNC/LNC-CS when rhodamine B was positive, and not embedded with

LNC/LNC-CS when rhodamine B was negative. The LNC/LNC-CS incorporation rate for the different treatments was calculated as the number of sperm cells positive for rhodamine B / number of sperm positive to H33342 (total number of cells). The result was multiplied by 100 to express the percentage.

### 2.5.2 Membrane integrity

Membrane integrity was verified by the fluorophores SYBR 14 and propidium iodide (PI) (MiniTube, Tiefenbach, Germany). Sperm aliquots from different treatments of LNC were homogenized and incubated for 10 min at 38 °C with fluorescent probe containing 0.25 mM of SYBR14 and 7.5 uM PI according to the manufacturer's instructions. The sperm cells were classified as not damaged and functional membrane (SYBR+ / PI -) and damaged and / or non-functional membrane (SYBR+ / PI +; SYBR- / PI +; SYBR- / PI-). The rate was calculated through the number of not damaged sperm and with functional membrane / number of sperm positive to H33342 and multiplied by 100 to express the percentage of spermatozoa in each category.

### 2.5.3 Acrosome integrity

The acrosomal integrity was assessed using the fluorescent dye Lectin from *Arachis hypogaea* (peanut) conjugated with FITC (FITC / PNA, L7381 Sigma, USA) which fluoresces green, in a final concentration of 10 µg / mL, and PI, which fluoresces red, in a final concentration of 15 µM. The samples from different concentrations of LNC and LNC-CS were homogenized and incubated for 10 min at 38 °C. Sperm cells were sorted by its acrosomes into complete and unreacted acrosomes (FITC / PI- and PNA-) and reacted and or harmed (FITC / PNA + and PI-; FITC / PNA – and PI +; FITC / PNA + and PI +). This rate was calculated by the number of sperm unreacted and complete / total number of sperm and multiplied by 100.

#### 2.5.4 Mitochondrial activity

Mitochondrial membrane potential was assessed by incubating for 10 min at 38° C with 3.1 µM of Rhodamine B and 7.5 µM of PI in 10 µL of samples exposed to different treatments LNC and LNC-CS. The sperm cells were classified as high functionality (high fluorescence by the accumulation of Rhodamine B) and low functionality (low fluorescence, low accumulation of rhodamine B), which assessed only intact spermatozoa (negative PI) (Liu et al., 2015). Mitochondria functionality rate was calculated by the number of sperm with high mitochondrial membrane potential / number of sperm with high mitochondrial membrane potential + sperm with low mitochondrial membrane potential and multiplied by 100.

#### 2.5.5 Lipid peroxidation

In order to evaluate lipid peroxidation, the sperm exposed to different concentrations of LNC and LNC-CS were loaded with Bodipy C11 (Hagedorn et al., 2012) at final concentration of 1 µM. This fluorescent probe shifts from red to green upon oxidation. The samples were homogenized and incubated with the probe for 2 hours at 38 °C. Lipid peroxidation rate was calculated by the median intensity of green fluorescence (peroxidated lipid) / median intensity of green fluorescence + median intensity of red fluorescence (lipid not peroxidated) and multiplied by 100.

#### 2.5.6 DNA damage

For assessment by flow cytometry of sperm cells with chromatin condensation, Sperm Chromatin Condensation Assay (SCCA) (Evenson et al., 1994) was used for all the concentrations of LNC and LNC-CS. This methodology assesses the stability of chromatin using the Acridine Orange dye (AO A6014) having metachromatic properties. For analysis, 10 µL of a semen sample were mixed with 90 µL of TNE (0.15 M/L NaCl, 0.01 M/l Tris-HCl, 1

mM/L EDTA, pH 7.4), 200 $\mu$ L of a Triton detergent solution, 0,17% Triton X-100, 0.15 M/L NaCl, and 0.08 M/L HCl; pH 1.2) after 30 seconds 120  $\mu$ L of Acridine Orange solution were added (6 mg/mL in 0.1 M/L citric acid, 0.2 m/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mmol/l EDTA, 0,15 mol/l NaCl; pH 6.0). The samples were incubated for 3 min before evaluation in flow cytometer. The sperm cells stained with green fluorescence were considered as with intact DNA, while those stained red/orange were considered as denatured or damaged DNA.

### *2.6 LNCs incorporation of images using confocal microscopy*

The images of RhoB-LNC and RhoB-LNC-CS treatments were acquired through Leica TCS SP8 scanning spectral confocal microscope (Solms, Germany). The images settings were fixed at the beginning of the acquisition and analysis steps, and were unchanged. Images were acquired sequentially using the following settings: rhodamine B (red) channel (confocal PMTZ650–700 nm), and DAPI (blue) channel (confocal HyDZ410–470 nm).

### *2.7 Statistical analysis*

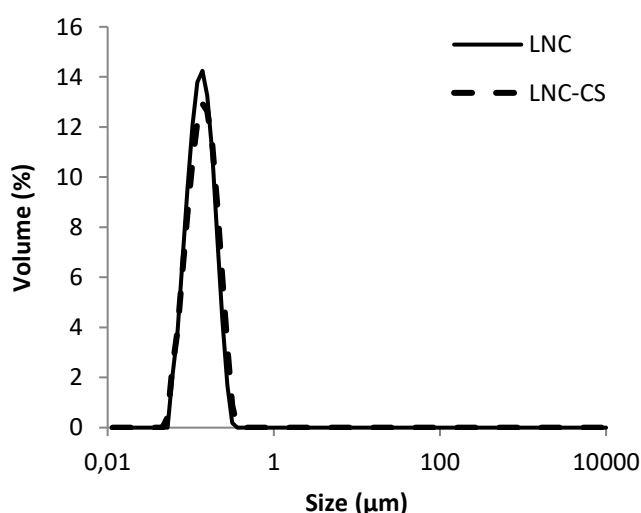
All parameters included on sperm kinetics and LNC and LNC-CS incorporation by sperm cells analyses were compared using factorial ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons. Membrane and acrosome integrity, mitochondrial activity, lipid peroxidation and DNA damage were compared by two-way ANOVA followed by a Tukey test for multiple comparisons. The results were reported as the mean values for each set of data  $\pm$  SEM and the level of statistical significance in all analysis was defined at probability level of  $P < 0.05$ .

## **3. RESULTS**

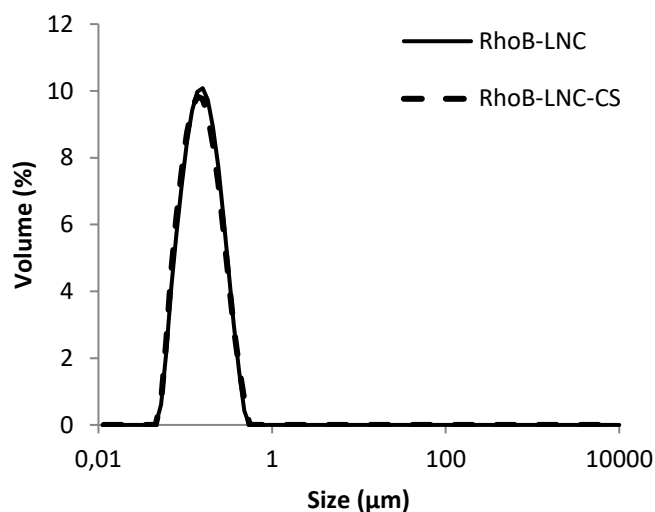
### 3.1 LNCs synthesis and characterization

LNC and LNC-CS formulations were macroscopically homogeneous presenting a milky-white appearance and, when diluted, a bluish opalescent aspect (Tyndall effect) evidencing the presence of nanoparticles. The laser diffraction analysis showed unimodal nanometric particle diameters (Figure 1). LNC had a z-average diameter of 132 nm with a polydispersity index of 0.12, while LNC-CS had z-average diameter of 145 nm with a polydispersity index of 0.23. The zeta potential values were -8.5 mV (LNC) and +12.8 mV (LNC-CS) reflected by the coatings of lecithin-polysorbate 80 for the former and lecithin-chitosan-polysorbate 80 for the latter.

Fluorescent-labeled formulations, RhoB-LNC and RhoB-LNC-CS, showed pinkish opalescent aspect, characteristic of Rhodamine B-labeled formulations. Laser diffraction analysis presented unimodal nanometric profiles (Figure 2) similar to those observed for LNC and LNC-CS. Furthermore, dynamic light scattering showed z-average diameters of 140 nm and PDI of 0.12 for RhoB-LNC and 254 nm and PDI of 0.34 for RhoB-LNC-CS. The zeta potential values were -12.5 mV for RhoB-LNC and +10.8 mV for RhoB-LNC-CS.



**Figure 1.** Particle size distribution by volume (laser diffraction): lipid-core nanocapsules (LNC) and chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS).



**Figure 2.** Particle size distribution by volume (laser diffraction): rhodamine B-labeled lipid-core nanocapsules (RhoB-LNC) and rhodamine B-labeled chitosan-coated lipid-core nanocapsules (RhoB-LNC-CS).

### 3.2 Sperm kinetics

An evaluation of LNC and LNC-CS effects on sperm motility and progressive motility was performed. The exposure significantly decreased sperm motility in LNC-CS at 80% and LNC 80% (v/v) ( $P < 0.05$ ) when compared to the M and W controls, and the treatments 2.5%, 5%, 10%, 20% (v/v) for both LNC and LNC-CS (Table 1). The progressive motility was lower in LNC-CS at 80% and LNC 80% (v/v) when compared to the M control. After 1h of incubation, all groups had reduced motility and progressive motility ( $P < 0.05$ ) (Table 1).

**Table 1.** Effect of different concentrations of LNC and LNC-CS in bovine sperm for motility and progressive motility.

| Groups    | Motility (%)              | Progressive motility (%)    |
|-----------|---------------------------|-----------------------------|
| Time 0 h  |                           |                             |
| Control 1 | 38.13 ± 4.65 <sup>a</sup> | 29.65 ± 5.78 <sup>a</sup>   |
| Control 2 | 35.91 ± 5.13 <sup>a</sup> | 25.82 ± 6.29 <sup>abc</sup> |

|            |                            |                             |
|------------|----------------------------|-----------------------------|
| LNC-CS 2.5 | 49.33 ± 9.38 <sup>a</sup>  | 36.29 ± 8.21 <sup>a</sup>   |
| LNC-CS 5   | 39.78 ± 6.03 <sup>a</sup>  | 27.00 ± 5.2 <sup>ab</sup>   |
| LNC-CS 10  | 42.66 ± 3.52 <sup>a</sup>  | 31.53 ± 3.9 <sup>a</sup>    |
| LNC-CS 20  | 48.76 ± 5.59 <sup>a</sup>  | 34.98 ± 6.4 <sup>a</sup>    |
| LNC-CS 40  | 42.38 ± 2.18 <sup>a</sup>  | 30.37 ± 4.04 <sup>abc</sup> |
| LNC-CS 80  | 7.46 ± 3.31 <sup>bc</sup>  | 1.59 ± 0.56 <sup>c</sup>    |
| LNC 2.5    | 36.18 ± 3.14 <sup>a</sup>  | 23.97 ± 5.3 <sup>ab</sup>   |
| LNC 5      | 33.89 ± 4.96 <sup>a</sup>  | 23.63 ± 5.50 <sup>abc</sup> |
| LNC 10     | 35.78 ± 4.85 <sup>a</sup>  | 26.53 ± 6.74 <sup>ab</sup>  |
| LNC 20     | 32.53 ± 3.35 <sup>a</sup>  | 21.22 ± 5.35 <sup>abc</sup> |
| LNC 40     | 25.82 ± 2.92 <sup>ab</sup> | 16.57 ± 4.08 <sup>abc</sup> |
| LNC 80     | 7.65 ± 1.89 <sup>c</sup>   | 3.78 ± 1.87 <sup>bc</sup>   |
| Time 1 h   |                            |                             |
| Control 1  | 29.08 ± 4.92 <sup>a</sup>  | 18.15 ± 4.67 <sup>a</sup>   |
| Control 2  | 18.48 ± 2.27 <sup>a</sup>  | 10.18 ± 2.85 <sup>abc</sup> |
| LNC-CS 2.5 | 24.90 ± 3.09 <sup>a</sup>  | 15.10 ± 4.43 <sup>a</sup>   |
| LNC-CS 5   | 25.89 ± 1.23 <sup>a</sup>  | 14.77 ± 2.53 <sup>ab</sup>  |
| LNC-CS 10  | 23.97 ± 4.94 <sup>a</sup>  | 14.51 ± 5.79 <sup>a</sup>   |
| LNC-CS 20  | 25.25 ± 4.66 <sup>a</sup>  | 14.90 ± 5.32 <sup>a</sup>   |
| LNC-CS 40  | 19.56 ± 3.59 <sup>a</sup>  | 8.58 ± 3.17 <sup>abc</sup>  |
| LNC-CS 80  | 13.74 ± 3.48 <sup>bc</sup> | 3.17 ± 1.22 <sup>c</sup>    |
| LNC 2.5    | 32.60 ± 1.48 <sup>a</sup>  | 19.99 ± 3.17 <sup>ab</sup>  |
| LNC 5      | 25.87 ± 3.00 <sup>a</sup>  | 16.64 ± 4.38 <sup>abc</sup> |
| LNC 10     | 26.27 ± 4.18 <sup>a</sup>  | 16.46 ± 5.23 <sup>ab</sup>  |
| LNC 20     | 27.01 ± 4.27 <sup>a</sup>  | 17.93 ± 6.11 <sup>abc</sup> |
| LNC 40     | 26.52 ± 2.21 <sup>ab</sup> | 15.59 ± 4.48 <sup>abc</sup> |
| LNC 80     | 9.30 ± 2.92 <sup>c</sup>   | 3.54 ± 1.27 <sup>bc</sup>   |

Data shown as Mean ± Standard Error for three replicates;

N = 5 bull semen samples; p>0.05.

The effect of LNC-CS and LNC on CASA parameters is shown in Table 2. Compared to the controls and to all other treatment groups, the CASA parameters were reduced ( $P<0.05$ ) in the presence of LNC-CS 80% and LNC 80% (v/v). There was no difference between the controls and the treatment groups 2.5%, 5%, 10%, 20% (v/v) for both LNC and LNC-CS in all CASA parameters. Also, an overall reduction ( $P<0.05$ ) can be perceived for all parameters at time 1h when compared to the exposure time 0h (Table 2).

Table 2.

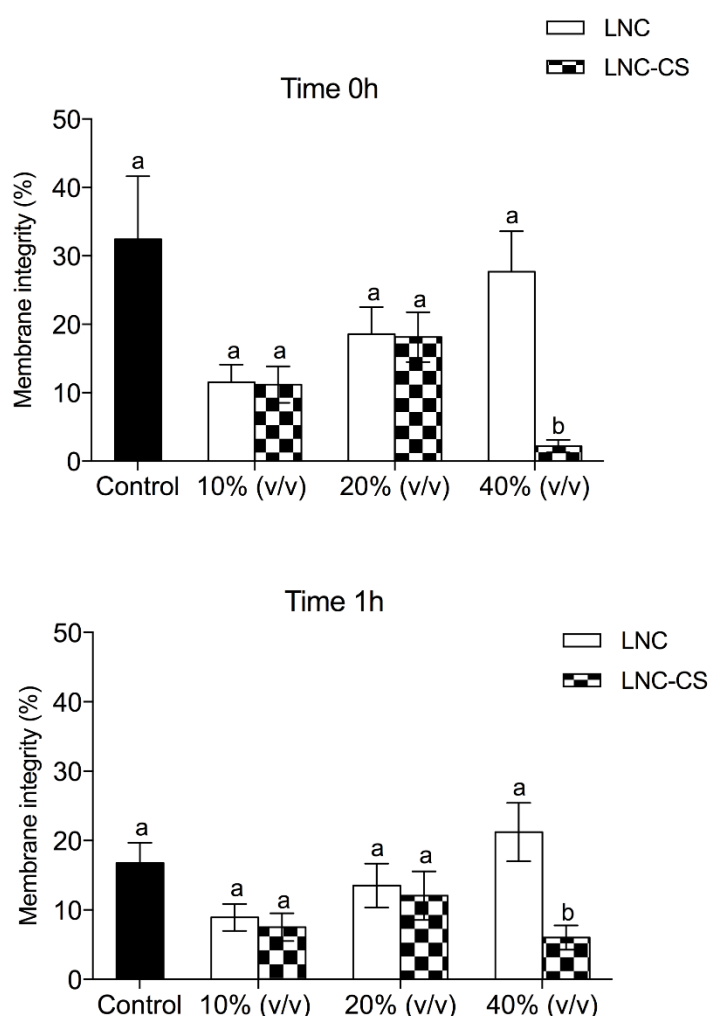
Effect in bovine sperm CASA parameters of different concentrations of LNC and LNC-CS.

| Groups             | DAP (μm)                   | DCL (μm)                   | DSL (μm)                   | VAP (μm/s)                  | VCL (μm/s)                   | VSL (μm/s)                   | STR (%)                  | LIN (%)                   | WOB (%)                  | ALH (μm)                 | BCF (Hz)                  |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|
| Time 0 h           |                            |                            |                            |                             |                              |                              |                          |                           |                          |                          |                           |
| Treatments % (v/v) |                            |                            |                            |                             |                              |                              |                          |                           |                          |                          |                           |
| LNC-CS 2.5         | 36.29 ± 8.21 <sup>ab</sup> | 51.43 ± 3.38 <sup>ab</sup> | 25.11 ± 1.78 <sup>ab</sup> | 67.93 ± 5.27 <sup>ab</sup>  | 115.04 ± 7.89 <sup>ab</sup>  | 56.54 ± 4.23 <sup>a</sup>    | 0.82 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.48 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.58 ± 0.00 <sup>a</sup> | 2.98 ± 0.26 <sup>a</sup> | 30.94 ± 1.39 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 5           | 27.00 ± 5.22 <sup>ab</sup> | 51.19 ± 1.11 <sup>ab</sup> | 24.80 ± 1.46 <sup>ab</sup> | 66.35 ± 3.18 <sup>ab</sup>  | 111.24 ± 2.37 <sup>ab</sup>  | 54.23 ± 3.13 <sup>ab</sup>   | 0.80 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.48 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.59 ± 0.02 <sup>a</sup> | 2.72 ± 0.04 <sup>a</sup> | 34.24 ± 1.22 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 10          | 31.53 ± 3.93 <sup>ab</sup> | 45.43 ± 4.34 <sup>ab</sup> | 22.43 ± 1.85 <sup>ab</sup> | 58.55 ± 4.12 <sup>ab</sup>  | 99.24 ± 8.52 <sup>ab</sup>   | 49.23 ± 3.73 <sup>abc</sup>  | 0.81 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.49 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.58 ± 0.01 <sup>a</sup> | 2.51 ± 0.16 <sup>a</sup> | 31.21 ± 1.53 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 20          | 34.98 ± 6.49 <sup>ab</sup> | 48.26 ± 2.77 <sup>ab</sup> | 24.01 ± 1.59 <sup>ab</sup> | 62.71 ± 3.89 <sup>ab</sup>  | 104.91 ± 5.77 <sup>ab</sup>  | 52.32 ± 3.41 <sup>abc</sup>  | 0.82 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.49 ± 0.01 <sup>a</sup>  | 0.59 ± 0.01 <sup>a</sup> | 2.67 ± 0.18 <sup>a</sup> | 32.85 ± 1.49 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 40          | 30.37 ± 4.04 <sup>c</sup>  | 35.02 ± 4.76 <sup>b</sup>  | 13.86 ± 1.79 <sup>bc</sup> | 40.12 ± 4.81 <sup>bc</sup>  | 76.32 ± 10.54 <sup>b</sup>   | 30.33 ± 4.16 <sup>cd</sup>   | 0.75 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.40 ± 0.02 <sup>ab</sup> | 0.53 ± 0.02 <sup>a</sup> | 2.29 ± 0.26 <sup>a</sup> | 26.96 ± 2.33 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 80          | 1.59 ± 0.56 <sup>c</sup>   | 4.65 ± 1.52 <sup>c</sup>   | 2.49 ± 0.79 <sup>c</sup>   | 7.92 ± 2.38 <sup>c</sup>    | 11.03 ± 3.35 <sup>c</sup>    | 6.11 ± 1.77 <sup>d</sup>     | 0.23 ± 0.06 <sup>b</sup> | 0.17 ± 0.04 <sup>b</sup>  | 0.22 ± 0.06 <sup>b</sup> | 0.71 ± 0.25 <sup>b</sup> | 6.29 ± 1.93 <sup>b</sup>  |
| LNC 2.5            | 23.97 ± 5.31 <sup>ab</sup> | 45.31 ± 8.08 <sup>ab</sup> | 21.42 ± 5.19 <sup>ab</sup> | 57.95 ± 12.45 <sup>ab</sup> | 97.97 ± 17.63 <sup>ab</sup>  | 46.64 ± 11.35 <sup>abc</sup> | 0.77 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.45 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.57 ± 0.01 <sup>a</sup> | 2.54 ± 0.31 <sup>a</sup> | 31.77 ± 2.73 <sup>a</sup> |
| LNC 5              | 23.63 ± 5.50 <sup>ab</sup> | 45.86 ± 6.64 <sup>ab</sup> | 22.47 ± 3.54 <sup>ab</sup> | 59.40 ± 8.78 <sup>ab</sup>  | 100.27 ± 14.58 <sup>ab</sup> | 49.54 ± 7.62 <sup>a</sup>    | 0.74 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.44 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.54 ± 0.03 <sup>a</sup> | 2.36 ± 0.31 <sup>a</sup> | 30.27 ± 3.51 <sup>a</sup> |
| LNC 10             | 26.53 ± 6.74 <sup>ab</sup> | 43.52 ± 6.16 <sup>ab</sup> | 20.55 ± 3.56 <sup>ab</sup> | 55.41 ± 5.58 <sup>ab</sup>  | 95.88 ± 13.50 <sup>ab</sup>  | 45.57 ± 7.74 <sup>abc</sup>  | 0.76 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.44 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.55 ± 0.03 <sup>a</sup> | 2.38 ± 0.26 <sup>a</sup> | 29.45 ± 3.79 <sup>a</sup> |
| LNC 20             | 21.22 ± 5.35 <sup>ab</sup> | 49.34 ± 5.17 <sup>ab</sup> | 22.90 ± 3.82 <sup>ab</sup> | 61.75 ± 8.32 <sup>ab</sup>  | 106.88 ± 11.67 <sup>ab</sup> | 49.90 ± 8.63 <sup>abc</sup>  | 0.77 ± 0.03 <sup>a</sup> | 0.44 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.57 ± 0.01 <sup>a</sup> | 2.63 ± 0.20 <sup>a</sup> | 33.28 ± 2.68 <sup>a</sup> |
| LNC 40             | 16.57 ± 4.08 <sup>c</sup>  | 36.77 ± 4.23 <sup>ab</sup> | 15.00 ± 2.16 <sup>bc</sup> | 43.67 ± 6.18 <sup>abc</sup> | 81.190 ± 10.08 <sup>ab</sup> | 33.24 ± 5.09 <sup>bc</sup>   | 0.71 ± 0.04 <sup>a</sup> | 0.39 ± 0.03 <sup>ab</sup> | 0.50 ± 0.02 <sup>a</sup> | 2.15 ± 0.21 <sup>a</sup> | 29.07 ± 3.11 <sup>a</sup> |
| LNC 80             | 3.78 ± 1.87 <sup>c</sup>   | 7.63 ± 3.05 <sup>c</sup>   | 4.44 ± 2.01 <sup>c</sup>   | 12.37 ± 5.07 <sup>c</sup>   | 17.54 ± 6.80 <sup>c</sup>    | 10.18 ± 4.47 <sup>d</sup>    | 0.41 ± 0.16 <sup>b</sup> | 0.30 ± 0.12 <sup>b</sup>  | 0.36 ± 0.14 <sup>b</sup> | 0.86 ± 0.48 <sup>b</sup> | 12.46 ± 5.29 <sup>b</sup> |
| Control M          | 29.65 ± 5.78 <sup>a</sup>  | 63.74 ± 2.87 <sup>a</sup>  | 31.74 ± 2.38 <sup>a</sup>  | 83.37 ± 4.57 <sup>a</sup>   | 140.51 ± 6.56 <sup>a</sup>   | 70.28 ± 5.34 <sup>a</sup>    | 0.83 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.50 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.59 ± 0.02 <sup>a</sup> | 3.33 ± 0.19 <sup>a</sup> | 33.77 ± 2.16 <sup>a</sup> |
| Control W          | 25.82 ± 6.29 <sup>ab</sup> | 46.66 ± 7.20 <sup>ab</sup> | 24.16 ± 4.50 <sup>ab</sup> | 63.84 ± 10.75 <sup>ab</sup> | 103.5 ± 14.83 <sup>ab</sup>  | 53.57 ± 9.52 <sup>ab</sup>   | 0.76 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.47 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.57 ± 0.03 <sup>a</sup> | 2.49 ± 0.33 <sup>a</sup> | 31.46 ± 3.34 <sup>a</sup> |
| Time 1 h           |                            |                            |                            |                             |                              |                              |                          |                           |                          |                          |                           |
| Treatments % (v/v) |                            |                            |                            |                             |                              |                              |                          |                           |                          |                          |                           |
| LNC-CS 2.5         | 15.10 ± 4.43 <sup>ab</sup> | 37.33 ± 4.49 <sup>ab</sup> | 16.02 ± 2.95 <sup>ab</sup> | 46.01 ± 6.40 <sup>ab</sup>  | 82.24 ± 9.37 <sup>ab</sup>   | 35.72 ± 6.44 <sup>a</sup>    | 0.64 ± 0.07 <sup>a</sup> | 0.37 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.48 ± 0.05 <sup>a</sup> | 2.13 ± 0.12 <sup>a</sup> | 30.26 ± 2.62 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 5           | 14.77 ± 2.53 <sup>ab</sup> | 40.45 ± 6.51 <sup>ab</sup> | 17.11 ± 2.74 <sup>ab</sup> | 46.54 ± 6.73 <sup>ab</sup>  | 87.36 ± 12.69 <sup>ab</sup>  | 36.85 ± 5.57 <sup>ab</sup>   | 0.75 ± 0.02 <sup>a</sup> | 0.43 ± 0.03 <sup>a</sup>  | 0.54 ± 0.02 <sup>a</sup> | 2.19 ± 0.19 <sup>a</sup> | 31.09 ± 3.27 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 10          | 14.51 ± 5.79 <sup>ab</sup> | 32.46 ± 6.44 <sup>ab</sup> | 13.27 ± 3.02 <sup>ab</sup> | 36.88 ± 7.13 <sup>ab</sup>  | 70.03 ± 13.72 <sup>ab</sup>  | 28.65 ± 6.65 <sup>abc</sup>  | 0.62 ± 0.08 <sup>a</sup> | 0.33 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.43 ± 0.05 <sup>a</sup> | 1.91 ± 0.34 <sup>a</sup> | 24.50 ± 3.74 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 20          | 14.90 ± 5.32 <sup>ab</sup> | 28.17 ± 5.69 <sup>ab</sup> | 10.36 ± 2.36 <sup>ab</sup> | 30.93 ± 6.32 <sup>ab</sup>  | 61.02 ± 11.92 <sup>ab</sup>  | 22.59 ± 4.97 <sup>abc</sup>  | 0.58 ± 0.07 <sup>a</sup> | 0.30 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.42 ± 0.06 <sup>a</sup> | 1.75 ± 0.34 <sup>a</sup> | 23.00 ± 3.86 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 40          | 8.58 ± 3.17 <sup>c</sup>   | 21.07 ± 4.32 <sup>b</sup>  | 6.99 ± 1.61 <sup>bc</sup>  | 21.79 ± 4.73 <sup>bc</sup>  | 45.73 ± 9.27 <sup>b</sup>    | 15.49 ± 6.59 <sup>cd</sup>   | 0.54 ± 0.10 <sup>a</sup> | 0.28 ± 0.06 <sup>ab</sup> | 0.40 ± 0.09 <sup>a</sup> | 1.62 ± 0.34 <sup>a</sup> | 20.94 ± 4.23 <sup>a</sup> |
| LNC-CS 80          | 3.17 ± 1.22 <sup>c</sup>   | 6.50 ± 1.84 <sup>c</sup>   | 3.55 ± 1.07 <sup>c</sup>   | 10.39 ± 3.07 <sup>c</sup>   | 15.07 ± 4.34 <sup>c</sup>    | 8.30 ± 2.48 <sup>d</sup>     | 0.40 ± 0.11 <sup>b</sup> | 0.28 ± 0.08 <sup>b</sup>  | 0.35 ± 0.10 <sup>b</sup> | 0.92 ± 0.25 <sup>b</sup> | 10.02 ± 2.63 <sup>b</sup> |
| LNC 2.5            | 19.99 ± 3.17 <sup>ab</sup> | 41.10 ± 6.99 <sup>ab</sup> | 20.63 ± 4.32 <sup>ab</sup> | 51.29 ± 9.80 <sup>ab</sup>  | 88.42 ± 45.03 <sup>ab</sup>  | 44.51 ± 9.29 <sup>abc</sup>  | 0.83 ± 0.01 <sup>a</sup> | 0.48 ± 0.02 <sup>a</sup>  | 0.56 ± 0.01 <sup>a</sup> | 2.08 ± 0.24 <sup>a</sup> | 32.46 ± 4.10 <sup>a</sup> |
| LNC 5              | 16.64 ± 4.38 <sup>ab</sup> | 43.98 ± 6.66 <sup>ab</sup> | 21.35 ± 4.50 <sup>ab</sup> | 55.72 ± 9.29 <sup>ab</sup>  | 97.73 ± 13.79 <sup>ab</sup>  | 47.05 ± 9.32 <sup>a</sup>    | 0.72 ± 0.07 <sup>a</sup> | 0.42 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.50 ± 0.04 <sup>a</sup> | 2.14 ± 0.22 <sup>a</sup> | 32.31 ± 4.56 <sup>a</sup> |
| LNC 10             | 16.46 ± 5.23 <sup>ab</sup> | 34.25 ± 6.14 <sup>ab</sup> | 15.68 ± 3.76 <sup>ab</sup> | 40.87 ± 8.42 <sup>ab</sup>  | 73.50 ± 13.23 <sup>ab</sup>  | 33.69 ± 8.04 <sup>abc</sup>  | 0.69 ± 0.06 <sup>a</sup> | 0.39 ± 0.04 <sup>a</sup>  | 0.48 ± 0.03 <sup>a</sup> | 2.06 ± 0.23 <sup>a</sup> | 28.95 ± 4.03 <sup>a</sup> |
| LNC 20             | 17.93 ± 6.11 <sup>ab</sup> | 26.71 ± 5.79 <sup>ab</sup> | 12.39 ± 3.12 <sup>ab</sup> | 33.46 ± 7.28 <sup>ab</sup>  | 57.50 ± 12.48 <sup>ab</sup>  | 26.78 ± 6.86 <sup>abc</sup>  | 0.67 ± 0.07 <sup>a</sup> | 0.40 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.51 ± 0.04 <sup>a</sup> | 1.67 ± 0.20 <sup>a</sup> | 25.57 ± 3.82 <sup>a</sup> |
| LNC 40             | 15.59 ± 4.48 <sup>c</sup>  | 28.26 ± 3.05 <sup>ab</sup> | 10.35 ± 1.59 <sup>bc</sup> | 29.67 ± 3.12 <sup>abc</sup> | 61.33 ± 5.61 <sup>ab</sup>   | 22.61 ± 3.15 <sup>bc</sup>   | 0.67 ± 0.05 <sup>a</sup> | 0.34 ± 0.03 <sup>ab</sup> | 0.45 ± 0.03 <sup>a</sup> | 1.64 ± 0.02 <sup>a</sup> | 25.60 ± 2.70 <sup>a</sup> |
| LNC 80             | 3.54 ± 1.27 <sup>c</sup>   | 3.49 ± 0.72 <sup>c</sup>   | 1.95 ± 0.37 <sup>c</sup>   | 5.35 ± 1.00 <sup>c</sup>    | 7.78 ± 1.57 <sup>c</sup>     | 4.36 ± 0.81 <sup>d</sup>     | 0.25 ± 0.04 <sup>b</sup> | 0.17 ± 0.03 <sup>b</sup>  | 0.21 ± 0.04 <sup>b</sup> | 0.33 ± 0.07 <sup>b</sup> | 6.22 ± 1.97 <sup>b</sup>  |
| Control M          | 18.15 ± 4.67 <sup>a</sup>  | 39.64 ± 8.30 <sup>a</sup>  | 20.18 ± 4.94 <sup>a</sup>  | 52.67 ± 12.23 <sup>a</sup>  | 85.54 ± 17.93 <sup>a</sup>   | 43.82 ± 10.69 <sup>a</sup>   | 0.70 ± 0.10 <sup>a</sup> | 0.42 ± 0.06 <sup>a</sup>  | 0.52 ± 0.08 <sup>a</sup> | 1.97 ± 0.34 <sup>a</sup> | 29.58 ± 5.71 <sup>a</sup> |
| Control W          | 10.18 ± 2.85 <sup>ab</sup> | 32.01 ± 8.62 <sup>ab</sup> | 16.12 ± 4.93 <sup>ab</sup> | 43.85 ± 12.48 <sup>ab</sup> | 69.78 ± 18.50 <sup>ab</sup>  | 35.39 ± 10.74 <sup>ab</sup>  | 0.57 ± 0.07 <sup>a</sup> | 0.37 ± 0.05 <sup>a</sup>  | 0.47 ± 0.05 <sup>a</sup> | 1.64 ± 0.33 <sup>a</sup> | 26.04 ± 3.96 <sup>a</sup> |

DAP (distance average path), DCL (distance curved line), DSL (distance straight line), VAP (velocity average path), VCL (velocity curved line), VSL (velocity straight line), STR (straightness, VSL/VAP), LIN (linearity, VSL/VCL), WOB (wobble, VAP/VCL), ALH (amplitude of lateral head displacement), and BCF (beat cross frequency). Data shown as Mean ± Standard Error for three replicates; N = 5 bull semen samples; p<0.05.

### 3.3.1 Membrane integrity

For sperm membrane integrity, a significant decrease ( $P<0.05$ ) was detected at 40% LNC-CS (v/v) exposure group at 0 and 1h. All other tested groups did not present impact on membrane integrity compared to the control (Figure 3).

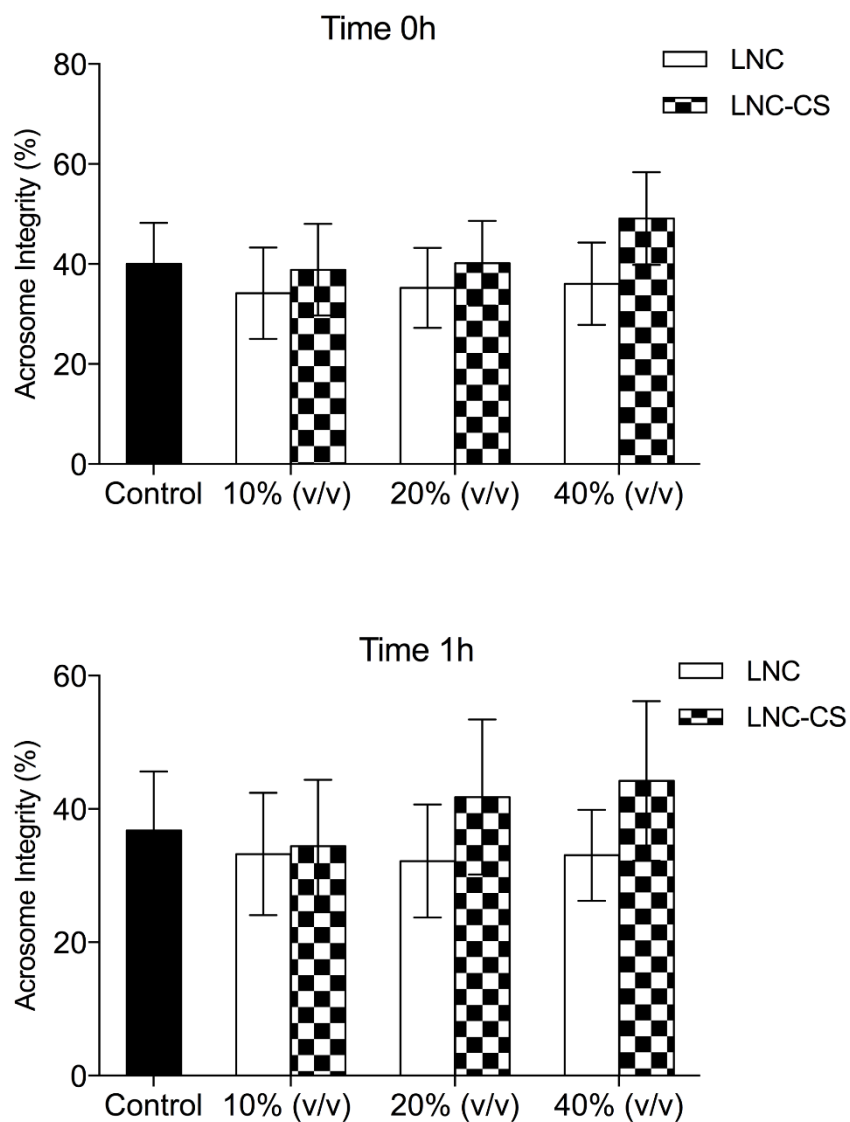


**Figure 3.** Effect of lipid-core nanocapsules (LNC) and chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS) on sperm membrane integrity at the beginning of the incubation period (time 0h) and after 1h exposition (time 1h) <sup>a,b</sup>: Difference among groups ( $P<0.05$ ).

### 3.3.2 Acrosome integrity

Data showed that the incubation of spermatozoa with LNCs kept the same acrosome integrity through all groups tested. Furthermore, despite overall slight decline for all

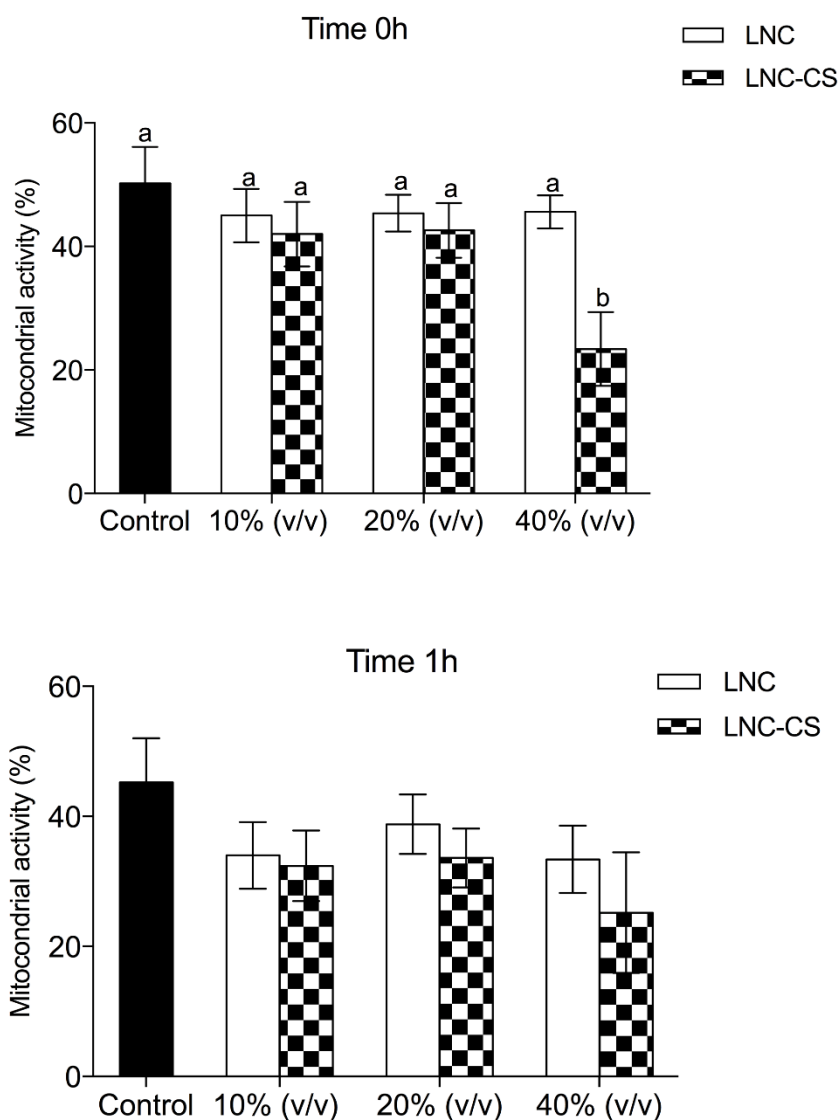
treatments after 1h incubation, there was no difference between control and experimental groups (Figure 4).



**Figure 4.** Effect of lipid-core nanocapsules (LNC) and chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS) on sperm acrosome integrity at the beginning of the incubation period (time 0h) and after 1h exposition (time 1h). There were no significant differences ( $P>0.05$ ) among groups.

### 3.3.3 Mitochondrial activity

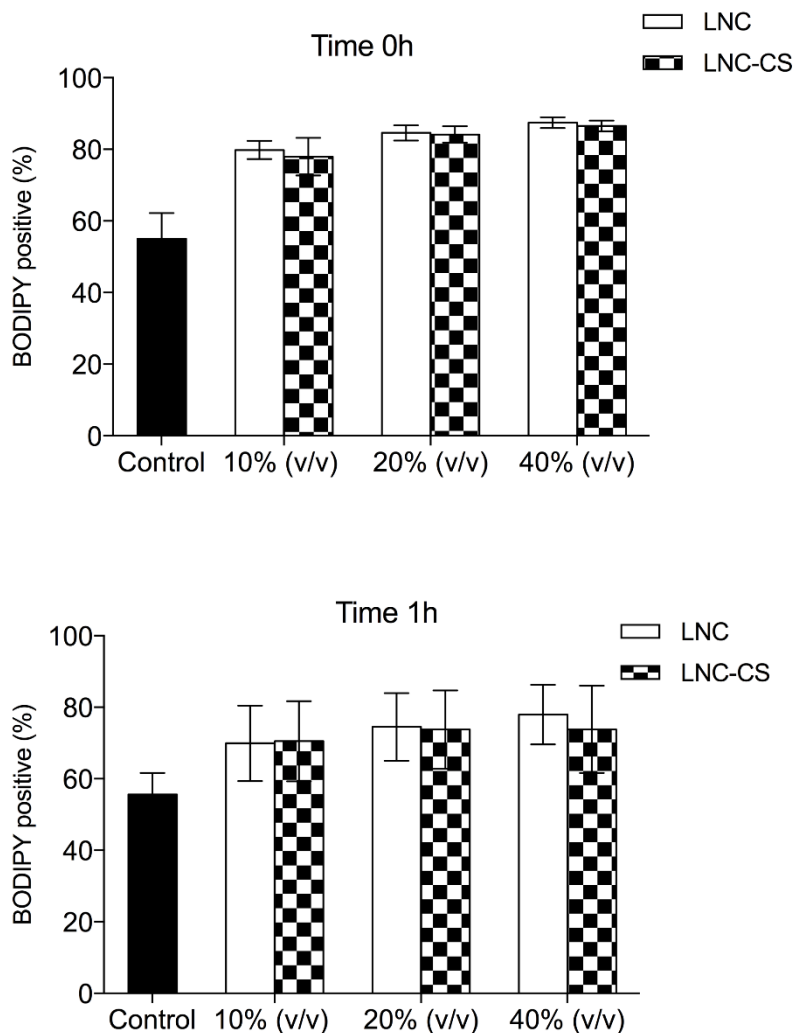
At time 0h, a decline in mitochondrial activity can be noted only at 40% LNC-CS (v/v) ( $P<0.05$ ), as showed on Figure 5. All remaining groups at times 0h and 1h, had no significant difference in relation to control.



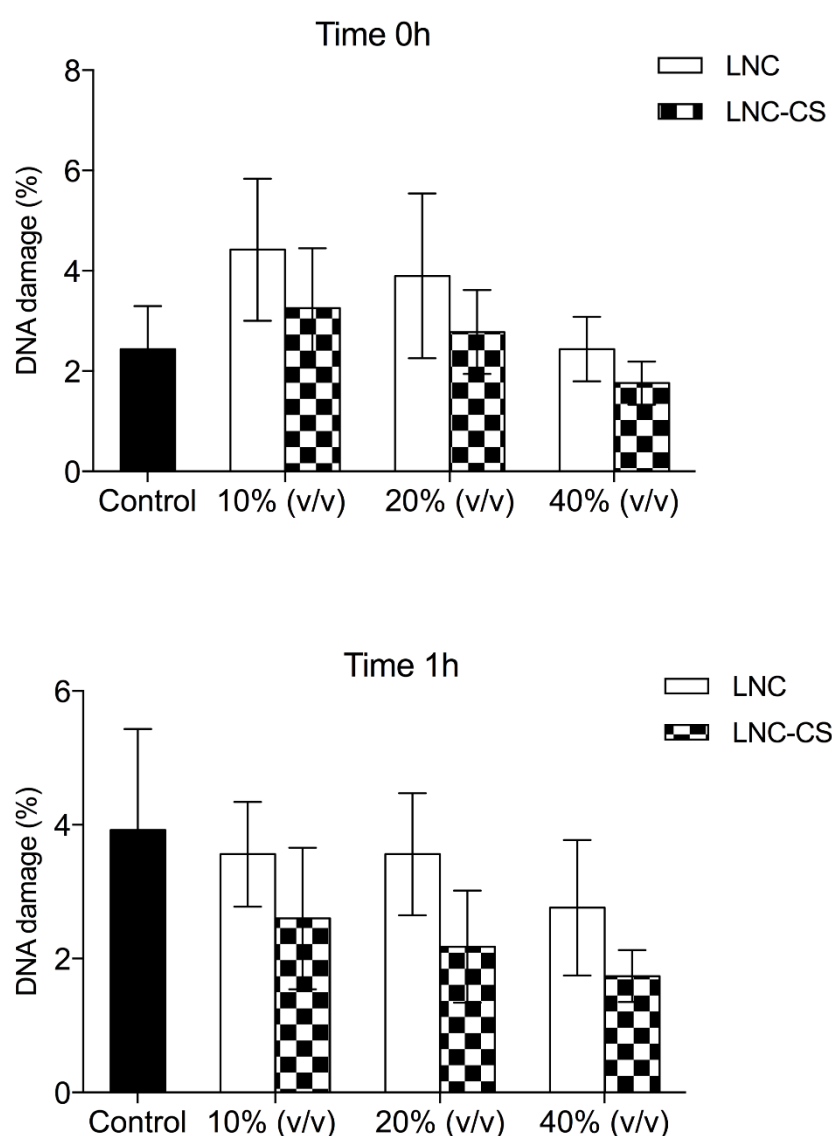
**Figure 5.** Effect of lipid-core nanocapsules (LNC) and chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS) on sperm mitochondrial activity at the beginning of the incubation period (time 0h) and after 1h exposition (time 1h). <sup>a,b</sup>: Difference among groups ( $P<0.05$ ). There were no significant differences ( $P>0.05$ ) between the groups at time 1 h.

### 3.3.4 Lipid peroxidation and DNA damage

There was no significant difference between the groups in both incubation times for lipid peroxidation (Figure 6) and DNA damage ( $P>0.05$ ) (Figure 7).



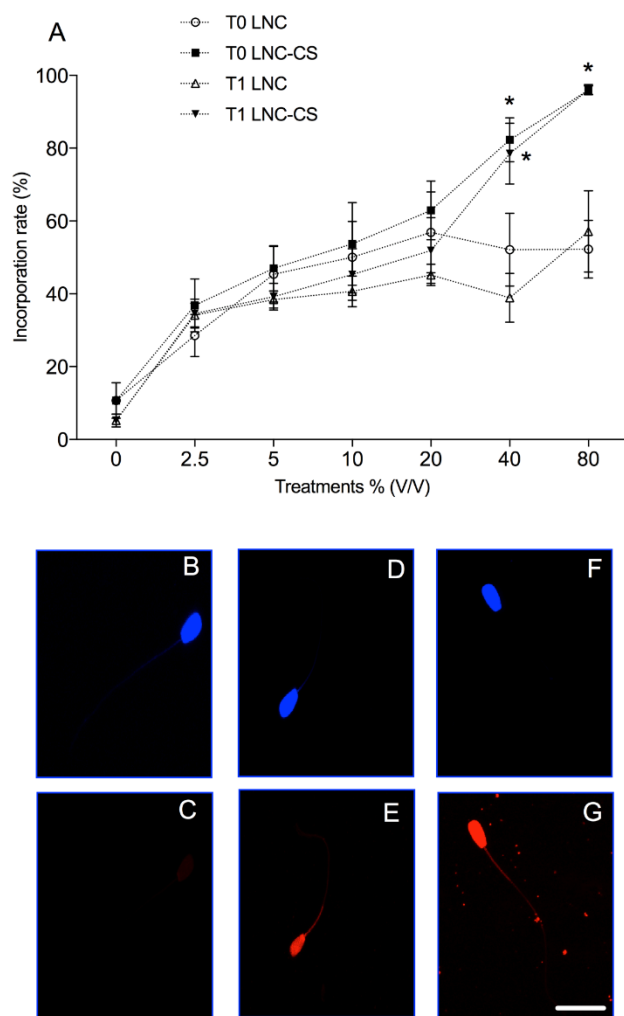
**Figure 6.** Effect of lipid-core nanocapsules (LNC) and chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS) on sperm lipid peroxidation (BODIPY positive cells) at the beginning of the incubation period (time 0h) and after 1h exposition (time 1h). There was no significant differences ( $P>0.05$ ) between the groups at time 0h and 1h.



**Figure 7.** Effect of lipid-core nanocapsules (LNC) and chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS) on sperm DNA damage at the beginning of the incubation period (time 0h) and after 1h exposition (time 1h). There was no significant differences ( $P>0.05$ ) between the groups at time 0h and 1h.

### 3.4 LNCs incorporation

Lipid-core nanocapsules uptake by bovine sperm cells was proportional to LNC concentration in solution. At concentrations 0, 2.5, 5, 10, and 20% (v/v) no statistical difference was observed between LNC and LNC-CS at both incubation times. At concentrations 40 and 80%, however, LNC-CS had higher cell uptake than uncoated LNC (Figure 8).



**Figure 8.** Analysis of lipid-core nanocapsules (LNC) and chitosan-coated lipid-core nanocapsules (LNC-CS) incorporation by sperm cells. (A) Incorporation rate of LNC and LNC-CS into sperm cells at the beginning of the incubation period (T0) and after 1h exposition (T1). Asterisk indicates significant difference between LNC and LNC-CS groups at 40 and 80 % V/V ( $P < 0.05$ ). Representative epifluorescence photomicrographs of sperm cells stained with Hoescht 33342 of Control (B), T0 LNC-CS 80 % V/V (D), T1 LNC-CS 80 % V/V (F) and treated with RhoB-LNC-CS Control (C), T0 LNC-CS 80 % V/V (E), T1 LNC-CS 80 % V/V (G). Scale bar = 10  $\mu$ m.

#### 4. DISCUSSION

It has been known that the use of living animals to study reproductive toxicity is the main available tool for hazard assessment. For this reason, alternative toxicity screening strategies which provide the reduction in animal use are urgently required. *In vitro* assays showed that gametes and embryos can be used efficiently to identify and understand the toxicology effects of different molecules (Beker et al., 2012; Komninou et al., 2016; Lucas et al., 2015; Remião et al., 2016; Scholz and Genschow, 1999; Tessaro et al., 2015).

Nanoparticulated systems have been extensively studied due to their potential applications in medicine and as carriers to deliver molecules into gametes and embryos (Barkalina et al., 2015; Campos et al., 2011; Mora-huertas et al., 2010). The sperm cells are able to spontaneously internalize exogenous DNA molecules and to deliver them to oocyte. Moreover, it has been shown that motility parameters can indirectly reflect its fertilization capability and be associated to male reproductive performance (Yuan et al., 2010). There are correlations between sperm viability, progression, swimming pattern alterations and fertility rate for rat spermatozoa (Duty et al., 2004; Moore and Mehdi, 1996).

LNC and LNC-CS demonstrated different characteristics despite the similar size. LNC-CS had its cationic polymer characteristics evidenced through positive zeta potential (+12.8 mV) as shown in previous studies (Liu et al., 2013; Mora-huertas et al., 2010), while LNC revealed negative zeta potential (-8.5 mV) due to the lecithin-polysorbate 80 coating. This difference in zeta potential between LNC and LNC-CS can be useful for future conjugation with a broad variety of molecules, such as proteins, carbohydrates and inorganic molecules (Liu and Park, 2010; Liu et al., 2013; Micheli et al., 2012). With a high incorporation rate, the lipid-core nanocapsules, especially LNC-CS, emerge as a promising tool for intracellular drug delivery. LNC was already successfully used as a carrier for molecules distribution (Huynh et al., 2009; Sánchez-Moreno et al., 2012; Schultze et al., 2014; Zanutto-filho et al., 2013).

Sperm motility decreased in groups incubated with 80% (v/v) of LNC and LNC-CS, when compared to M and W controls, and the treatments 2.5%, 5%, 10%, 20% (v/v) for both LNC and LNC-CS. Also, the progressive motility was lower in LNC-CS at 80% (v/v) when compared to the M control. A powerful tool for sperm viability examination is kinetics analysis. Motility and progressive motility data can be used to assess any effect that may be upon sperm cells, such as stress generated by thawing or environmental influence (Martínez-Pastor et al., 2011). For all others CASA parameters, spermatozoa distance (DAP, DCL, DSL), velocity (VAP, VCL, VSL, STR, LIN, WOB), amplitude (ALH) and frequency (BCL), a negative impact was detected in groups incubated with LNC and LNCs at 80% (v/v) at 0 and 1 hour. Remaining LNC and LNC-CS groups ranging from 2.5% to 20% (v/v) had no statistically difference to the control groups. A significant decrease was detected in the values of semen motion parameters in the controls and treated groups after 1 hour of exposition. However, as previously described, the decline also observed in the control groups, would not be enough to totally compromise fertilizing potential (Canovas et al., 2010). The dispersion observed between the values is due to the biological variability, as we have used samples from five different bulls.

Using flow cytometry, we measured membrane and acrosome integrity, mitochondrial activity, lipid peroxidation and DNA damage. As much as CASA analysis, the flow cytometry approach can be very applicable for prediction of bovine semen fertility (Sellem et al., 2015). We observed a decline in the membrane integrity exposed to 40% (v/v) of LNC-CS at 0 and 1 hour of exposition time. The chitosan has high biodegradability, low toxicity and is capable to charge positively nanoparticles, improving its interaction with the cell membrane, and inducing the entry of the nanocapsules into cells (Guo et al., 2013; Nagamoto et al., 2004). A previously study showed that Chitosan-modified poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles

had a transient effect on the membrane integrity, but did not have any influence on cell viability (Guo et al., 2013).

The LNC and LNC-CS groups ranging from 2.5% to 20% (v/v) exhibited an action similar to the control groups, suggesting that the nanocarrier was not cytotoxic to the sperm cells. Our results corroborate with results in literature demonstrating the lack of toxicity by lipid-core nanocapsules and chitosan-coated lipid-core nanocapsules (Bender et al., 2012; Bulcão et al., 2014, 2013; Lucas et al., 2015; Siqueira et al., 2011). In conclusion, LNC and LNC-CS (positively and negatively charged, respectively) up to the concentration of 20% (v/v), had no impact on sperm viability parameters such as kinetics and cell morphology. Additionally, a high incorporation rate of nanocapsules by sperm cells demonstrates the important potential as intracellular nanocarrier.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by Brazilian funding agencies CAPES, CNPq and FAPERGS.

## REFERENCES

- Andersson, M.A., Mikkola, R., Raulio, M., Kredics, L., Maijala, P., Salkinoja-Salonen, M.S., 2009. Acrebol, a novel toxic peptaibol produced by an *Acremonium exuviarum* indoor isolate. *J. Appl. Microbiol.* 106, 909–923. doi:10.1111/j.1365-2672.2008.04062.x
- Barkalina, N., Jones, C., Wood, M.J.A., Coward, K., 2015. Extracellular vesicle-mediated delivery of molecular compounds into gametes and embryos: Learning from nature. *Hum. Reprod. Update* 21, 627–639. doi:10.1093/humupd/dmv027
- Beker, A., Woudenberg, V., Gröllers-mulderij, M., Snel, C., Jeurissen, N., Stierum, R., Wolterbeek, A., 2012. The bovine oocyte in vitro maturation model : A potential tool for reproductive toxicology screening 34, 251–260.
- Bender, E. a., Adorne, M.D., Colomé, L.M., Abdalla, D.S.P., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2012. Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *Int. J. Pharm.* 426, 271–279. doi:10.1016/j.ijpharm.2012.01.051
- Bulcão, R.P., Freitas, F.A. De, Dallegrave, E., Venturini, C.G., Baierle, M., Durgante, J., Sauer, E., Cassini, C., Cerski, C.T., Zielinsky, P., Salvador, M., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Garcia, S.C., 2014. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 86, 167–177. doi:10.1016/j.ejpb.2013.04.001
- Bulcão, R.P., Freitas, F.A., Venturini, C.G., Dallegrave, E., Durgante, J., Göethel, G., Cerski, C.T.S., Zielinsky, P., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., Garcia, S.C., 2013. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly( $\epsilon$ -Caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. *Toxicol. Sci.* 132, 162–176. doi:10.1093/toxsci/kfs334
- Campos, V.F., Komninou, E.R., Urtiaga, G., de Leon, P.M., Seixas, F.K., Dellagostin, O.A., Deschamps, J.C., Collares, T., 2011. NanoSMGT: Transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. *Theriogenology* 75, 1476–1481. doi:10.1016/j.theriogenology.2011.01.009
- Canovas, S., Gutierrez-Adan, A., Gadea, J., 2010. Effect of exogenous DNA on bovine sperm functionality using the sperm mediated gene transfer (SMGT) technique. *Mol. Reprod. Dev.* 77, 687–698. doi:10.1002/mrd.21205
- Dobrovolskaia, M.A., Patri, A.K., Zheng, J., Clogston, J.D., Ayub, N., Aggarwal, P., Neun, B.W., Hall, J.B., McNeil, S.E., 2009. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* 5, 106–117. doi:10.1016/j.nano.2008.08.001
- Durli, T.L., Dimer, F.A., Fontana, M.C., Pohlmann, A.R., Beck, R.C.R., Guterres, S.S., 2013. Innovative approach to produce submicron drug particles by vibrational atomization spray drying: influence of the type of solvent and surfactant 9045, 1–10. doi:10.3109/03639045.2013.798804
- Duty, S.M., Calafat, A.M., Silva, M.J., Brock, J.W., Ryan, L., Chen, Z., Overstreet, J., Hauser, R., 2004. The relationship between environmental exposure to phthalates and computer-aided sperm analysis motion parameters. *J. Androl.* 25, 293–302.
- Evenson, D.P., Thompson, L., Jost, L., 1994. Flow cytometric evaluation of boar semen by the sperm chromatin structure assay as related to cryopreservation and fertility.

- Theriogenology 41, 637–651. doi:10.1016/0093-691X(94)90174-H
- Fiel, L.A., Contri, R.V., Bica, J.F., Figueiró, F., Maria, A., Battastini, O., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2014. Labeling the oily core of nanocapsules and lipid-core nanocapsules with a triglyceride conjugated to a fluorescent dye as a strategy to particle tracking in biological studies 1–11. doi:10.1186/1556-276X-9-233
- García-Vázquez, F.A., García-Rosell, E., Gutiérrez-Adán, A., Gadea, J., 2009. Effect of sperm treatment on efficiency of EGFP-expressing porcine embryos produced by ICSI-SMGT. *Theriogenology* 72, 506–518. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.04.006
- Guo, M., Rong, W.-T., Hou, J., Wang, D.-F., Lu, Y., Wang, Y., Yu, S.-Q., Xu, Q., 2013. Mechanisms of chitosan-coated poly ( lactic-co-glycolic acid ) nanoparticles for improving oral absorption of 245101. doi:10.1088/0957-4484/24/24/245101
- Hagedorn, M., McCarthy, M., Carter, V.L., Meyers, S.A., 2012. Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *PLoS One* 7. doi:10.1371/journal.pone.0039397
- Huynh, N.T., Passirani, C., Saulnier, P., Benoit, J.P., 2009. Lipid nanocapsules : A new platform for nanomedicine 379, 201–209. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.04.026
- 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., Bordignon, V., Seixas, F.K., Campos, V.F., Guterres, S.S., Collares, T. V., 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*. doi:10.1371/journal.pone.0157561
- Lazzari, G., Tessaro, I., Crotti, G., Galli, C., Hoffmann, S., Bremer, S., Pellizzer, C., 2008. Development of an in vitro test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 233, 360–370. doi:10.1016/j.taap.2008.08.019
- Liu, N., Park, H.J., 2010. Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 76, 16–19. doi:10.1016/j.colsurfb.2009.09.041
- Liu, Q., Wang, X., Wang, W., Zhang, X., Xu, S., Ma, D., Xiao, Z., Xiao, Y., Li, J., 2015. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 413–422. doi:10.1007/s10695-014-9993-9
- Liu, W., Liu, J., Li, T., Liu, C., Liu, W., 2013. Improved physical and in vitro digestion stability of a polyelectrolyte delivery system based on layer-by-layer self-assembly alginate-chitosan-coated nanoliposomes. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4133–4144. doi:10.1021/jf305329n
- Lorenzetti, S., Altieri, I., Arabi, S., Balduzzi, D., Bechi, N., Cordelli, E., Galli, C., Ietta, F., Modina, S.C., Narciso, L., Pacchierotti, F., Villani, P., Galli, A., Lazzari, G., Luciano, A.M., Paulesu, L., Spanio, M., Mantovani, A., 2011. Innovative non-animal testing strategies for reproductive toxicology: The contribution of Italian partners within the EU project ReProTect. *Ann. Ist. Super. Sanita* 47, 429–444. doi:10.4415/ANN\_11\_04\_16
- 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. *Reprod. Toxicol.* 58, 131–139. doi:10.1016/j.reprotox.2015.10.004
- Mahapatro, A., Singh, D.K., 2011. Biodegradable nanoparticles are excellent vehicle for site directed in-vivo delivery of drugs and vaccines. *J. Nanobiotechnology* 9, 55. doi:10.1186/1477-3155-9-55
- 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. *Theriogenology* 75, 783–95. doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.034
- Micheli, M., Bova, R., Magini, A., Polidoro, M., Emiliani, C., 2012. Lipid-Based Nanocarriers for CNS-Targeted Drug Delivery 71–86.
- Mikkola, R., Andersson, M.A., Teplova, V., Grigoriev, P., Kuehn, T., Loss, S., Tsitko, I., Apetroaie, C., Saris, N.E.L., Veijalainen, P., Salkinoja-Salonen, M.S., 2007. Amylosin from *Bacillus amyloliquefaciens*, a K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channel-forming toxic peptide containing a polyene structure. *Toxicon* 49, 1158–1171. doi:10.1016/j.toxicon.2007.02.010
- Moore, H., Mehdi, A., 1996. Fertilizing capacity of rat spermatozoa is correlated with decline in straight-line velocity measured by continuous computer-aided sperm analysis: epididymal rat spermatozoa from the proximal cauda have a greater fertilizing capacity in vitro than those f. *J. Androl.* 17. doi:10.1002/j.1939-4640.1996.tb00586.x
- Mora-huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A., 2010. Polymer-based nanocapsules for drug delivery 385, 113–142. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018
- Nagamoto, T., Hattori, Y., Takayama, K., Maitani, Y., 2004. Novel Chitosan Particles and Chitosan-Coated Emulsions Inducing Immune Response via Intranasal Vaccine Delivery 21, 2–5.
- Oliveira, C.P., Leon, P.M.M., Guterres, S.S., Seixas, F.K., 2014. Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line 1583–1591.
- Peltola, J., Ritieni, A., Mikkola, R., Grigoriev, P.A., P??csfalvi, G., Andersson, M.A., Salkinoja-Salonen, M.S., 2004. Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 4996–5004. doi:10.1128/AEM.70.8.4996-5004.2004
- Petrunkina, A.M., Volker, G., Weitze, K.F., Beyerbach, M., Töpfer-Petersen, E., Waberski, D., 2005. Detection of cooling-induced membrane changes in the response of boar sperm to capacitating conditions. *Theriogenology* 63, 2278–2299. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.10.008
- Pohlmann, A.R., Fonseca, F.N., Paese, K., Detoni, C.B., Coradini, K., Beck, R.C., Guterres, S.S., 2013. Poly( $\epsilon$ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 10, 623–38. doi:10.1517/17425247.2013.769956
- 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., Varela, A.S., Seixas, F.K., Campos, V.F., Guterres, S.S., Collares, T. V., 2016. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reprod. Toxicol.* doi:10.1016/j.reprotox.2016.05.016

- Sánchez-Moreno, P., Ortega-Vinuesa, J.L., Martín-Rodríguez, A., Boulaiz, H., Marchal-Corrales, J.A., Peula-García, J.M., 2012. Characterization of different functionalized lipidic nanocapsules as potential drug carriers. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 2405–2424. doi:10.3390/ijms13022405
- Schaffazick, S.R., Pohlmann, A.R., Cordova, C.A.S. De, Creczynski-pasa, T.B., Guterres, S.S., 2005. Protective properties of melatonin-loaded nanoparticles against lipid peroxidation 289, 209–213. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.11.003
- Scholz, G., Genschow, E., 1999. Embryotoxicity Screening Using Embryonic Stem Cells in vitro : Correlation to in vivo Teratogenicity 203–211.
- Schultze, E., Ourique, A., Campello, V., Rech, K., Thurow, H., Marques, P., Leon, M. De, Farias, V., Antônio, O., Guterres, S.R., Pohlmann, A.R., Kömmling, F., Carlos, R., Beck, R., Collares, T., 2014. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 87, 55–63. doi:10.1016/j.ejpb.2014.02.003
- Sellem, E., Broekhuijse, M.L.W.J., Chevrier, L., Camugli, S., Schmitt, E., Schibler, L., Koenen, E.P.C., 2015. Theriogenology Use of combinations of in vitro quality assessments to predict fertility of bovine semen. *Theriogenology* 84, 1447–1454.e5. doi:10.1016/j.theriogenology.2015.07.035
- Siqueira, N.M., Contri, R.V., Paese, K., Beck, R.C.R., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S., 2011. Innovative Sunscreen Formulation Based on Benzophenone-3-Loaded Chitosan-Coated Polymeric Nanocapsules. *Skin Pharmacol. Physiol.* 24, 166–174. doi:10.1159/000323273
- Tessaro, I., Modina, S.C., Crotti, G., Franciosi, F., Colleoni, S., Lodde, V., Galli, C., Lazzari, G., Luciano, A.M., 2015. Transferability and inter-laboratory variability assessment of the in vitro bovine oocyte fertilization test. *Reprod. Toxicol.* 51, 106–113. doi:10.1016/j.reprotox.2015.01.001
- Weiss-angeli, V., Poletto, F.S., Marco, S.L. De, Salvador, M., Silveira, N.P., Guterres, S.S., Pohlmann, A.R., 2012. Sustained Antioxidant Activity of Quercetin-Loaded 2874–2880. doi:10.1166/jnn.2012.5770
- Yuan, C., Wang, C., Gao, S., Kong, T., Chen, L., Li, X., Song, L., Wang, Y., 2010. Toxicology in Vitro Effects of permethrin , cypermethrin and 3-phenoxybenzoic acid on rat sperm motility in vitro evaluated with computer-assisted sperm analysis. *Toxicol. Vitr.* 24, 382–386. doi:10.1016/j.tiv.2009.11.001
- Zanotto-filho, A., Coradini, K., Braganhol, E., Schröder, R., Melo, C., Oliveira, D., Simões-pires, A., Maria, A., Battastini, O., Raffin, A., Stanisçuaski, S., Mateus, C., Carlos, R., Beck, R., Cláudio, J., Moreira, F., 2013. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 83, 156–167. doi:10.1016/j.ejpb.2012.10.019

## 5 CONCLUSÃO GERAL

Neste trabalho podemos concluir:

1. As nanocápsulas de núcleo lipídico, sejam revestidas por quitosana ou sem revestimento, promovem toxicidade irrelevante às células espermáticas, quando incubados em até 40% de concentração (v/v).
2. A motilidade e a morfologia, os parâmetros de qualidade espermática e predição de fertilidade mais validados, não demonstraram alterações significativas.
3. As nanocápsulas exibem potencial promissor como nanocarreadores de diversos tipos de estruturas para o interior de células espermáticas, dado o potencial zeta oposto entre LNC e LNC-CS.

## 7 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, A., BERTOLLA, R.P. & SAMANTA, L. (2016). Sperm proteomics: potential impact on male infertility treatment. *Expert Review of Proteomics*. 9450(February). p. 14789450.2016.1151357. Available at: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/14789450.2016.1151357>.
- ALMEIDA, M.C.SI. DE (2014). *Impacto da diluição isotérmica e bitérmica sobre a qualidade do sêmen suíno*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Available at: <http://hdl.handle.net/10183/97864>.
- AMANN, R.P. & WABERSKI, D. (2014). Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments. *Theriogenology*. 81(1). p. 3–5.
- ARRUDA, R., CELEGHINI, E.C.C., GARCIA, A.R., SANTOS, G.C., LEITE, T.G., OLIVEIRA, L.Z., LANÇONI, R. & RODRIGUES, M.. (2015). Morfologia espermática de touros: interpretação e impacto na fertilidade. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*. 39(1). p. 47–60.
- BENDER, E. A., ADORNE, M.D., COLOMÉ, L.M., ABDALLA, D.S.P., GUTERRES, S.S. & POHLMANN, A.R. (2012). Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. *International Journal of Pharmaceutics*. 426(1–2). p. 271–279. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.051>.
- BERNARDI, A., ZILBERSTEIN, A.A.C.C. V, JÄGER, E., CAMPOS, M.M., MORRONE, F.B., CALIXTO, J.B., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S. & BATTASTINI, A.M.O. (2009). Effects of indomethacin-loaded nanocapsules in experimental models of inflammation in rats. *British Journal of Pharmacology*. 158(4). p. 1104–1111.
- BOTELLA, P., MUNIESA, C., VICENTE, V. & CABRERA-GARCÍA, A. (2016). Effect of drug precursor in cell uptake and cytotoxicity of redox-responsive camptothecin nanomedicines. *Materials Science and Engineering C*. 58. p. 692–699. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.09.012>.
- BROUWERS, J.F., SILVA, P.F.N. & GADELLA, B.M. (2017). New assays for detection and localization of endogenous lipid peroxidation products in living boar sperm after BTS dilution or after freeze-thawing. *Theriogenology*. 63(2). p. 458–469. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.09.046>.
- CAMPOS, V.F., KOMNINOU, E.R., URTIAGA, G., DE LEON, P.M., SEIXAS, F.K., DELLAGOSTIN, O. A., DESCHAMPS, J.C. & COLLARES, T. (2011). NanoSMGT: Transfection of exogenous DNA on sex-sorted bovine sperm using nanopolymer. *Theriogenology*. 75(8). p. 1476–1481. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.01.009>.
- CAMPOS, V.F., DE LEON, P.M.M., KOMNINOU, E.R., DELLAGOSTIN, O.A., DESCHAMPS, J.C., SEIXAS, F.K. & COLLARES, T. (2011). NanoSMGT: Transgene transmission into bovine embryos using halloysite clay nanotubes or nanopolymer to improve transfection efficiency. *Theriogenology*. 76(8). p. 1552–1560. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.06.027>.
- CARDOSO, T.F., VARELA, J.S., SILVA, E.F., VILELA, J., HARTMANN, A., JARDIM, R.D., COLARES, E.P. & CORCINI, C.D. (2014). Influence of mineral, olive or sunflower oils on male reproductive parameters in vitro - the wild rodent *Calomys laucha*. *Andrologia*. 46(7). p. 722–725.

- CARMONA-RIBEIRO, A.M. (2010). Biomimetic nanoparticles: preparation, characterization and biomedical applications. *International journal of nanomedicine*. 5. p. 249–259.
- CHANTLER, E., ABRAHAM-PESKIR, J. & ROBERTS, C. (2004). Consistent presence of two normally distributed sperm subpopulations within normozoospermic human semen: A kinematic study. *International Journal of Andrology*. 27(6). p. 350–359.
- CHEMES, H.E. & RAWE, V.Y. (2003). Sperm pathology: A step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men. *Human Reproduction Update*. 9(5). p. 405–428.
- COBB, M. (2012). An amazing 10 years: The discovery of egg and sperm in the 17th century. *Reproduction in Domestic Animals*. 47(SUPPL.4). p. 2–6.
- COOPER, H.S. (1984). Lectins as probes in histochemistry and immunohistochemistry: The peanut (*Arachis hypogaea*) lectin. *Human Pathology*. 15(10). p. 904–906. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0046817784801173>.
- CROWLEY, L.C., MARFELL, B.J. & WATERHOUSE, N.J. (2016). Analyzing cell death by nuclear staining with Hoechst 33342. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2016(9). p. 778–781.
- D'CRUZ, O.J. & HAAS, G.G. (1996). Fluorescence-labeled fucolectins are superior markers for flow cytometric quantitation of the human sperm acrosome reaction\*\*Presented in part at the 28th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, University of California, Davis, Califo. *Fertility and Sterility*. 65(4). p. 843–851. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0015028216582247>.
- D'OCCHIO, M.J., HENGSTBERGER, K.J. & JOHNSTON, S.D. (2007). Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal Reproduction Science*. 101(1–2). p. 1–17.
- D'OCCHIO, M.J., HENGSTBERGER, K.J. & JOHNSTON, S.D. (2007). Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. *Animal reproduction science*. 101(1–2). p. 1–17.
- DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, Á., MARTÍNEZ-PASTOR, F., FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R., DEL OLMO, E., BISBAL, A., ROS-SANTAELLA, J.L. & GARDE, J.J. (2010). Comparison of the TBARS Assay and BODIPY C11 Probes for Assessing Lipid Peroxidation in Red Deer Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(6).
- DRUMMEN, G.P.C., VAN LIEBERGEN, L.C.M., OP DEN KAMP, J.A.F. & POST, J.A. (2002). C11-BODIPY581/591, an oxidation-sensitive fluorescent lipid peroxidation probe: (Micro)spectroscopic characterization and validation of methodology. *Free Radical Biology and Medicine*. 33(4). p. 473–490.
- ENCISO, M., PIECZENIK, G., COHEN, J. & WELLS, D. (2012). Development of a novel synthetic oligopeptide for the detection of DNA damage in human spermatozoa. *Human Reproduction*. 27(8). p. 2254–2266.
- EVENSON, D.P., DARZYNKIEWICZ, Z. & MELAMED, M.R. (1980). Relation of Mammalian Sperm Chromatin concentrations suggests that it may be Heterogeneity to Fertility. *Science*. 210(December). p. 1–3.
- EVENSON, D.P. & WIXON, R. (2006). Clinical aspects of sperm DNA fragmentation detection and male infertility. *Theriogenology*. 65(5). p. 979–991.

- EVENSON, D.P. & WIXON, R. (2005). Environmental toxicants cause sperm DNA fragmentation as detected by the Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA??). In *Toxicology and Applied Pharmacology*.
- FANG, C.-L., AL-SUWAYEH, S.A. & FANG, J.-Y. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. *Recent patents on nanotechnology*. 7(1). p. 41–55. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22946628>.
- FARRELL, P.B., FOOTE, R.H. & ZINAMAN, M.J. (1996). Motility and other characteristics of human sperm can be measured by computer-assisted sperm analysis of samples stained with Hoechst 33342. *Fertility and sterility*. 66(3). p. 446–453.
- FAWCETT, D.W. (1965). The anatomy of the mammalian spermatozoon with particular reference to the guinea pig. *Zeitschrift für Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*. 67(3). p. 279–296.
- FAWCETT, D.W. (1975). The mammalian spermatozoon. *Developmental Biology*. 44(2). p. 394–436.
- FRANK, L.A., CONTRI, R. V., BECK, R.C.R., POHLMANN, A.R. & GUTERRES, S.S. (2015). Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 7(5). p. 623–639.
- FREIRES, I.A., SARDI, J. DE C.O., DE CASTRO, R.D. & ROSALEN, P.L. (2016). Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? *Pharmaceutical Research*. Available at: <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-016-2069-z>.
- FREOUR, T., JEAN, M., MIRALLIE, S., DUBOURDIEU, S. & BARRIERE, P. (2010). Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) parameters and their evolution during preparation as predictors of pregnancy in intrauterine insemination with frozen-thawed donor semen cycles. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology*. 149(2). p. 186–189.
- FROZZA, R.L., BERNARDI, A., PAESE, K., HOPPE, J.B., DA 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(6). p. 694–703.
- GAWECKA, J.E., BOAZ, S., KASPERSON, K., NGUYEN, H., EVENSON, D.P. & WARD, W.S. (2015). Luminal fluid of epididymis and vas deferens contributes to sperm chromatin fragmentation. *Human Reproduction*. 30(12). p. 2725–2736.
- GILLAN, L., EVANS, G. & MAXWELL, W.M.C. (2005). Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. In *Theriogenology*. p. 445–457.
- GREEN, D.P.L. (1992). Comparison of Hoechst 33342 and propidium iodide as fluorescent markers for sperm fusion with hamster oocytes. *J. Reprod. Fert.*. 96. p. 581–591.
- HALL, J.E. & GUYTON, A.C. (2011). *Guyton and Hall book of Medical Physiology*,
- HARAYASHIKI, C.A.Y., JUNIOR, A.S.V., MACHADO, A.A. DE S., CABRERA, L. DA C., PRIMEL, E.G., BIANCHINI, A. & CORCINI, C.D. (2013). Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. *Aquatic Toxicology*. 142–143. p. 176–184.

- HINKLEY, R.E., WRIGHT, B.D. & LYNN, J.W. (1986). Rapid visual detection of sperm-egg fusion using the DNA-specific fluorochrome Hoechst 33342. *Developmental Biology*. 118(1). p. 148–154.
- HIRSJÄRVI, S., SANCEY, L., DUFORT, S., BELLOCHE, C., VANPOUILLE-BOX, C., GARCION, E., COLL, J.L., HINDRÉ, F. & BENOIT, J.P. (2013). Effect of particle size on the biodistribution of lipid nanocapsules: Comparison between nuclear and fluorescence imaging and counting. *International Journal of Pharmaceutics*. 453(2). p. 594–600.
- HO, H.C. & SUAREZ, S.S. (2001). Hyperactivation of mammalian spermatozoa: Function and regulation. *Reproduction*. 122(4). p. 519–526.
- HOSSAIN, M.S., JOHANNISSON, A., WALLGREN, M., NAGY, S., SIQUEIRA, A.P. & RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. (2011). Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: state of the art. *Asian journal of andrology*. 13(3). p. 406–419. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2011.15>.
- JOLCK, R.I., FELDBORG, L.N., ANDERSEN, S., MOGHIMI, S.M. & ANDRESEN, T.L. (2011). Engineering liposomes and nanoparticles for biological targeting. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*. 125. p. 251–280.
- JONES, C.J., BENBOW, E.W., KNOX, W.F. & STODDART, R.W. (1988). Method for showing human spermatogenesis using *Arachis hypogaea* (AHA) lectin. *Journal of Clinical Pathology*. 41(9). p. 1017–1018. Available at: <http://jcp.bmj.com/cgi/doi/10.1136/jcp.41.9.1017>.
- KATZ, D.F. & DAVIS, R.O. (1986). Automatic analysis of human sperm motion. *Journal of andrology*. 8. p. 170–181.
- KATZ, D.F., ERICKSON, R.P. & NATHANSON, M. (1979). Beat frequency is bimodally distributed in spermatozoa from T/t12 mice. *Journal of Experimental Zoology*. 210(3). p. 529–535.
- KHAN, I., KHAN, M., UMAR, M.N. & OH, D.-H. (2015). Nanobiotechnology and its applications in drug delivery system: a review. *IET nanobiotechnology / IET*. 9(6). p. 396–400. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26647817>.
- KIME, D.E., VAN LOOK, K.J., MCALLISTER, B.G., HUYSKENS, G., RURANGWA, E. & OLLEVIER, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*. 130(4). p. 425–433.
- KOMNINO, E.R., REMIAO, M.H., LUCAS, C.G., DOMINGUES, W.B., BASSO, A.C., JORNADA, D.S., DESCHAMPS, J.C., BECK, R.C.R., POHLMANN, A.R., BORDIGNON, 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(6). p. E0157561.
- KOMNINO, 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., BORDIGNON, 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(6).

- KRISHAN, A. (1975). Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *The Journal of cell biology*. 66(1). p. 188–193.
- KRUGER, T. (1995). Computer-assisted sperm analysis systems: morphometric aspects. *Human reproduction (Oxford, England)*. 10 Suppl 1. p. 46–52.
- LARSEN, L., SCHEIKE, T., JENSEN, T.K., BONDE, J.P., ERNST, E., HJOLLUND, N.H., ZHOU, Y., SKAKKEBAEK, N.E. & GIWERCMAN, A. (2000). Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population. The Danish First Pregnancy Planner Study Team. *Human reproduction (Oxford, England)*. 15(7). p. 1562–1567.
- LAZZARI, G., TESSARO, I., CROTTI, G., GALLI, C., HOFFMANN, S., BREMER, S. & PELLIZZER, C. (2008). Development of an in vitro test battery for assessing chemical effects on bovine germ cells under the ReProTect umbrella. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 233(3). p. 360–370.
- LIISBERG, M.F. (1968). Rhodamine B as an extremely specific stain for cornification. *Acta anatomica*. 69(1). p. 52–57.
- LOPES, F.M., VARELA JUNIOR, A.S., CORCINI, C.D., DA SILVA, A.C., GUZZELLI, V.G., TAVARES, G. & DA ROSA, C.E. (2014). Effect of glyphosate on the sperm quality of zebrafish *Danio rerio*. *Aquatic Toxicology*. 155. p. 322–326.
- LORENZETTI, S., ALTIERI, I., ARABI, S., BALDUZZI, D., BECHI, N., CORDELLI, E., GALLI, C., IETTA, F., MODINA, S.C., NARCISO, L., PACCHIEROTTI, F., VILLANI, P., GALLI, A., LAZZARI, G., LUCIANO, A.M., PAULESU, L., SPAN??, M. & MANTOVANI, A. (2011). Innovative non-animal testing strategies for reproductive toxicology: The contribution of Italian partners within the EU project ReProTect. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*. 47(4). p. 429–444.
- LUCAS, C.G., REMÍÃO, 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 (Elmsford, N.Y.)*. 58. p. 131–139. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890623815300290> [Accessed November 9, 2015].
- LYBAERT, P., DANGUY, A., LELEUX, F., MEURIS, S. & LEBRUN, P. (2009). Improved methodology for the detection and quantification of the acrosome reaction in mouse spermatozoa. *Histology and Histopathology*. 24(8). p. 999–1007.
- MARSHALL, J.D., EVELAND, W.C. & SMITH, C.W. (1958). Superiority of Fluorescein Isothiocyanate (Riggs) for Fluorescent-Antibody Technic with a Modification of its Application. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 98(4). p. 898–900. Available at: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3181/00379727-98-24222>.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F., MATA-CAMPUZANO, M., ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M., ÁLVAREZ, M., ANEL, L. & DE PAZ, P. (2010). Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*. 45(SUPPL. 2). p. 67–78.
- 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. *Theriogenology*. 75(5). p. 783–795.
- MARZEC-WRÓBLEWSKA, U., KAMINSKI, P. & LAKOTA, P. (2012). Influence of chemical elements on mammalian spermatozoa. *Folia Biologica (Czech Republic)*. 58(1). p. 7–15.
- MASTERS, W.H. & JOHNSON, V.E. (1966). *Human sexual response*, Available at: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=psych&AN=1966-35042-000&login.asp&site=ehost-live>.
- MAYER, C. (2005). Nanocapsules as drug delivery systems. *The International journal of artificial organs*. 28(11). p. 1163–1171.
- MAYEVSKY, A., BAR-SAGIE, D. & BARTOOV, B. (1983). Sperm cell motility as a new experimental model for toxicological studies. *Archives of toxicology. Supplement. = Archiv fur Toxikologie. Supplement*. 6. p. 295–299.
- MENKVELD, R., HOLLEBOOM, C. A G. & RHEMREV, J.P.T. (2011). Measurement and significance of sperm morphology. *Asian journal of andrology*. 13(1). p. 59–68. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2010.67>.
- MICHELI, M.-R., BOVA, R., MAGINI, A., POLIDORO, M. & EMILIANI, C. (2012). Lipid-Based Nanocarriers for CNS-Targeted Drug Delivery. *Recent Patents on CNS Drug Discovery*. 7(1). p. 71–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22283231>.
- MIYAKI, L.A.M., SIBOV, T.T., PAVON, L.F., MAMANI, J.B. & GAMARRA, L.F. (2012). Study of internalization and viability of multimodal nanoparticles for labeling of human umbilical cord mesenchymal stem cells. *Einstein (São Paulo, Brazil)*. 10(2). p. 189–96. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23052454>.
- MIYAZAKI, R., FUKUDA, M., TAKEUCHI, H., ITOH, S. & TAKADA, M. (1990). Flow cytometry to evaluate acrosome-reacted sperm. *Archives of andrology*. 25(3). p. 243–251.
- MORA-HUERTAS, C.E., FESSI, H. & ELAISSARI, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. . 385. p. 113–142.
- MORA-HUERTAS, C.E., FESSI, H. & ELAISSARI, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics*. 385(1–2). p. 113–142.
- MORIMOTO, N., WAKAMURA, M., MURAMATSU, K., TOITA, S., NAKAYAMA, M., SHOJI, W., SUZUKI, M. & WINNIK, F.M. (2016). Membrane Translocation and Organelle-Selective Delivery Steered by Polymeric Zwitterionic Nanospheres. *Biomacromolecules*. 17(4). p. 1523–1535.
- MORTIMER, S.T. (1997). A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. *Human Reproduction Update*. 3(5). p. 403–439.
- MORTIMER, S.T., VAN DER HORST, G. & MORTIMER, D. (2015). The future of computer-aided sperm analysis. *Asian journal of andrology*. 17(4). p. 545–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25926614> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4492043>.
- NIU, Z., HUANG, X., JIA, X., ZHENG, J., YUAN, Y., SHI, T., DIAO, H., YU, H., SUN, F., ZHANG, H., SHI, H. & FENG, Y. (2011). A sperm viability test using SYBR-14/propidium iodide flow cytometry as a tool for rapid screening of primary ciliary dyskinesia patients and for choosing sperm sources for intracytoplasmic sperm

- injection. *Fertility and sterility*. 95(1). p. 389–392.
- OCKLEFORD, C.D., HSI, B.L., WAKELY, J., BADLEY, R.A., WHYTE, A. & FAULK, W.P. (1981). Propidium iodide as a nuclear marker in immunofluorescence. I. Use with tissue and cytoskeleton studies. *Journal of immunological methods*. 43(3). p. 261–267.
- ODHIAMBO, J.F., SUTOVSKY, M., DEJARNETTE, J.M., MARSHALL, C. & SUTOVSKY, P. (2011). Adaptation of ubiquitin-PNA based sperm quality assay for semen evaluation by a conventional flow cytometer and a dedicated platform for flow cytometric semen analysis. *Theriogenology*. 76(6). p. 1168–1176.
- ORTEGA, M.A., SIL, P. & WARD, W.S. (2011). Mammalian sperm chromatin as a model for chromatin function in DNA degradation and DNA replication. *Systems biology in reproductive medicine*. 57(1–2). p. 43–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21204750> [Accessed July 28, 2016].
- ORTEGA FERRUSOLA, C., GONZÁLEZ FERNÁNDEZ, L., MORRELL, J.M., SALAZAR SANDOVAL, C., MACÍAS GARCÍA, B., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H., TAPIA, J.A. & PEÑA, F.J. (2009). Lipid peroxidation, assessed with BODIPY-C 11, increases after cryopreservation of stallion spermatozoa, is stallion-dependent and is related to apoptotic-like changes. *Reproduction*. 138(1). p. 55–63.
- OWEN, D.H. & KATZ, D.F. (2005). A review of the physical and chemical properties of human semen and the formulation of a semen simulant. *Journal of andrology*. 26(4). p. 459–69. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15955884>.
- OYARZUN-AMPUERO, F.A., GARCIA-FUENTES, M., TORRES, D. & ALONSO, M.J. (2010). Chitosan-coated lipid nanocarriers for therapeutic applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 20(4). p. 259–265.
- PAP, E.H.W., DRUMMEN, G.P.C., WINTER, V.J., KOOIJ, T.W. A., RIJKEN, P., WIRTZ, K.W. A., OP DEN KAMP, J. A. F., HAGE, W.J. & POST, J. A. (1999). Ratio-fluorescence microscopy of lipid oxidation in living cells using C11-BODIPY581/591. *FEBS Letters*. 453(3). p. 278–282. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014579399006961>.
- PARTYKA, A., NIZAŃSKI, W. & ŁUKASZEWICZ, E. (2010). Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometry. *Theriogenology*. 74(6). p. 1019–1027.
- PELÁEZ, J. & LONG, J. A (2007). Characterizing the glycocalyx of poultry spermatozoa: I. Identification and distribution of carbohydrate residues using flow cytometry and epifluorescence microscopy. *Journal of andrology*. 28(2). p. 342–352.
- PINTADO, B., DE LA FUENTE, J. & ROLDAN, E.R. (2000). Permeability of boar and bull spermatozoa to the nucleic acid stains propidium iodide or Hoechst 33258, or to eosin: accuracy in the assessment of cell viability. *Journal of reproduction and fertility*. 118(1). p. 145–152.
- POLETO, F.S., JÄGER, E., CRUZ, L., POHLMANN, A.R. & GUTERRES, S.S. (2008). The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Materials Science and Engineering C*. 28(4). p. 472–478.
- PUPPO, V. & PUPPO, G. (2016). Comprehensive review of the anatomy and physiology of male ejaculation: Premature ejaculation is not a disease. *Clinical Anatomy*. 29(1). p. 111–119.
- REMAIO, M.H., LUCAS, C.G., DOMINGUES, W.B., SILVEIRA, T., BARTHER, N.N., KOMNINO, U.

- 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* (Elmsford, N.Y.). 63. p. 70–81.
- 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., VARELA, A.S., SEIXAS, F.K., CAMPOS, V.F., GUTERRES, S.S. & COLLARES, T. V (2016). Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reproductive Toxicology*.
- RESNIER, P., LEQUINIO, P., LAUTRAM, N., ANDRÉ, E., GAILLARD, C., BASTIAT, G., BENOIT, J.P. & PASSIRANI, C. (2014). Efficient in vitro gene therapy with PEG siRNA lipid nanocapsules for passive targeting strategy in melanoma. *Biotechnology Journal*. 9(11). p. 1389–1401.
- RIETH, A., POTHIER, F. & SIRARD, M.A. (2000). Electroporation of bovine spermatozoa to carry DNA containing highly repetitive sequences into oocytes and detection of homologous recombination events. *Molecular Reproduction and Development*. 57(4). p. 338–345.
- RIJSSELAERE, T., VAN SOOM, A., MAES, D. & NIZANSKI, W. (2012). Computer-assisted sperm analysis in dogs and cats: an update after 20 years. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 47 Suppl 6. p. 204–207.
- RUSSELL WMS, B.K. (1992). The principles of humane experimental technique. *UFAW, London*. (October 1959). p. AVAILABLE FROM: [HTTP://ALTWEB.JHSPH.EDU/](http://ALTWEB.JHSPH.EDU/).
- SCHENK, B., WEIMER, M., BREMER, S., VAN DER BURG, B., CORTVRINDT, R., FREYBERGER, A., LAZZARI, G., PELLIZZER, C., PIERSMA, A., SCHÄFER, W.R., SEILER, A., WITTERS, H. & SCHWARZ, M. (2010). The ReProTect Feasibility Study, a novel comprehensive in vitro approach to detect reproductive toxicants. *Reproductive Toxicology*. 30(1). p. 200–218. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2010.05.012>.
- SCHULTZE, E., OURIQUE, A., YURGEL, V.C., BEGNINI, K.R., THUROW, H., DE LEON, P.M.M., CAMPOS, V.F., DELLAGOSTIN, O.A., GUTERRES, S.R., POHLMANN, A.R., SEIXAS, F.K., BECK, R.C.R. & COLLARES, T. (2014). Encapsulation in lipid-core nanocapsules overcomes lung cancer cell resistance to tretinoin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 87(1). p. 55–63. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.02.003>.
- SILVA, P.F.N. & GADELLA, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. In *Theriogenology*. p. 958–978.
- SOPPIMATH, K.S., AMINABHAVI, T.M., KULKARNI, A.R. & RUDZINSKI, W.E. (2001). Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*. 70(1–2). p. 1–20.
- SPIELMANN, H. (2009). The Way Forward in Reproductive / Developmental Toxicity Testing. *Atla*. 37(October). p. 641–656.
- STAUSS, C.R., VOTTA, T.J. & SUAREZ, S.S. (1995). Sperm Motility Hyperactivation Facilitates Penetration of the Hamster Zona Pellucida'. *BIOLOGY OF*

*REPRODUCTION*. 53. p. 1280–1285.

- SUAREZ, S.S. & HO, H.C. (2003). Hyperactivated motility in sperm. *Reproduction in Domestic Animals*. 38(2). p. 119–124.
- SUTOVSKY, P., AARABI, M., MIRANDA-VIZUETE, A. & OKO, R. (2015). Negative biomarker based male fertility evaluation: Sperm phenotypes associated with molecular-level anomalies. *Asian Journal of Andrology*. 17(4). p. 554. Available at: <http://www.ajandrology.com/text.asp?2015/17/4/554/153847>.
- TURNER, R.M. (2006). Moving to the beat: A review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*. 18(1–2). p. 25–38.
- VONARBOURG, A., PASSIRANI, C., SAULNIER, P. & BENOIT, J.-P. (2006). Parameters influencing the stealthiness of colloidal drug delivery systems. *Biomaterials*. 27(24). p. 4356–4373.
- WEIN, A.J., KAVOUSSI, L.R., NOVICK, A.C., PARTIN, A.W. & PETERS, C. A. (2012). *Campbell-Walsh Urology 10th Edition*, Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-1-4160-6911-9.00061-X>.
- WILLIAMS, E.S., PANKO, J. & PAUSTENBACH, D.J. (2009). The European Union's REACH regulation: a review of its history and requirements. *Crit.Rev.Toxicol.* 39(December 2008). p. 553–575.
- WILSON-LEEDY, J.G. & INGERMANN, R.L. (2007). Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology*. 67(3). p. 661–672.
- XU, D., WU, K., ZHANG, Q., HU, H., XI, K., CHEN, Q., YU, X., CHEN, J. & JIA, X. (2010). Synthesis and biocompatibility of anionic polyurethane nanoparticles coated with adsorbed chitosan. *Polymer*. 51(9). p. 1926–1933.
- YANAGIMACHI, R. (1994). Mammalian fertilization. *The physiology of reproduction*. 1. p. 189–317.
- YANIZ, J.L., PALACIN, I., VICENTE-FIEL, S., GOSALVEZ, J., LOPEZ-FERNANDEZ, C. & SANTOLARIA, P. (2013). Comparison of membrane-permeant fluorescent probes for sperm viability assessment in the ram. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*. 48(4). p. 598–603.
- YURGEL, V.C., OLIVEIRA, C.P., BEGNINI, K.R., SCHULTZE, E., THUROW, H.S., LEON, P.M.M., DELLAGOSTIN, O.A., CAMPOS, V.F., BECK, R.C.R., GUTERRES, S.S., COLLARES, T., POHLMANN, A.R. & SEIXAS, F.K. (2014). Methotrexate diethyl ester-loaded lipid-core nanocapsules in aqueous solution increased antineoplastic effects in resistant breast cancer cell line. *International journal of nanomedicine*. 9. p. 1583–1591.
- ZHENG, J., QI, S., ZHU, H. & XIAO, X. (2016). Toxicity of Hoechst 33342: implication in side population analysis. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. 62(7). p. 27–30.
- ZURLO, J. (2012). No Animals Harmed: Toward a Paradigm Shift in Toxicity Testing. *Hastings Center Report*. 42(SUPPL. 1). p. 23–26.