

NANOPARTÍCULAS DE LDL DIMINUEM CRIOINJÚRIAS DE MEMBRANA ESPERMÁTICA DURANTE A CRIOPRESERVAÇÃO

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

¹Universidade Federal de Pelotas – edenara_anastacio@hotmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – dudadode@hotmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – stelagheller@hotmail.com

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

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

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

1. INTRODUÇÃO

A lipoproteína de baixa densidade (LDL) é uma bionanopartícula micelar, com monômeros de 8 a 1,200 nm de dimensões (HEVONOJA, PENTIKAINEN *et al.* 2000, SKAJAA, CORMODE *et al.* 2011, HARISA AND ALANAZI 2014). O LDL proveniente de diluentes à base de gema de ovo, é considerado um dos responsáveis pela proteção das células espermáticas contra o choque térmico e manutenção da motilidade após a criopreservação (BERNARDI AND COOK 1960, MOUSSA, MARINET *et al.* 2002, PRAPAIWAN, THARASANIT *et al.* 2016).

Estruturas na escala manométrica apresentam propriedades funcionais únicas, não encontradas na escala macro (CHAU, WU *et al.* 2007), devido principalmente à sua elevada área superficial, que resulta em uma intensa interação com a matriz na qual estão inseridas (ASSI, ZAVAREZE *et al.* 2012). Geradores de ultrassons e homogeneizadores de alta pressão, são métodos de homogeneização, diminuição, dispersão e emulsificação de partículas (KENTISHA, WOOSTERB *et al.* 2008), utilizados na nanotecnologia, podendo ser empregado em lipídeos como o LDL (DAS AND CHAUDHURY 2011).

Este estudo objetivou avaliar diferentes protocolos de produção de nanoemulsões de LDL, sobre a qualidade do sêmen canino criopreservado.

2. METODOLOGIA

Para o experimento utilizou-se 10 cães oriundos de criadores locais (2 Shih-Tzu, 1 Bulldog Inglês, 1 Bulldog Americano, 4 Labradores Retriever, 1 Australian Cattle Dog, 1 Golden Retriever). Foram realizadas seis coletas pelo método de manipulação digital, onde apenas as frações ricas com motilidade espermática igual ou superior a 80 % foram processadas, totalizando deste modo, 15 ejaculados.

O plasma de gema de ovo (LDLControle), com concentração final de aproximadamente 20% de gema e 8% de LDL, foi obtido através de três centrifugações sucessivas a 10.000 x g por 45 minutos do diluente Tris-gema (2,4 g TRIS; 1,4 g ácido cítrico, 0,8 g glicose, q.s.p 100 mL de água de injeção, 40% de gema de ovo, pH 6,8 – 7,2), descartando-se os *pellets* formados entre as centrifugações. Posteriormente o diluente foi submetido aos diferentes métodos de produção de nanopartículas: LDLBanho - Banho de ultrassom (140 A / 30 min.); LDLPonteira - Ponteira de ultrassom (30 min.); LDLHomogeneizador – UltraTurrax (14500 rpm / 2 min) seguido de Homogeneizador de Alta Pressão (10.000 PSI / 6 ciclos).

Após a coleta, a fração rica dos ejaculados foram divididas em quatro porções de mesmo volume e diluídas com os diferentes tratamentos isotérmicos, para obtenção de 200×10^6 células / mL. Posteriormente adicionou-se o diluente de criopreservação (1:1 / v:v), constituído dos respectivos tratamentos acrescidos de 10% de glicerol, para obtenção de uma concentração final de 5%. As amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 mL, mantidas por 2 horas à 4°C, submetidas por 10 min. a 5 cm do vapor de nitrogênio líquido, e posteriormente submersas e acondicionadas neste.

Após o descongelamento (37°C por 30 seg), avaliou-se a integridade de membrana plasmática, através de citometria de fluxo através do Attune Acoustic Focusing Cytometer® (Applied Biosystems). Os resultados obtidos para os diferentes tratamentos foram comparados por análise de variância com comparação de médias pelo teste LSD All-Pairwise, através do software Statistix® (2010).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O percentual de membrana íntegra foi significativamente maior para LDLPonteira quando comparado ao LDLControle ($P < 0,05$) (Fig. 1). Sugere-se que nanoemulsões processadas por ponteira de ultrassom seja mais eficiente na homogeneização, emulsificação e diminuição no diâmetro das micelas de LDL, resultando assim em uma maior crioproteção dos espermatozoides, devido à maior disponibilidade das nanopartículas frente às membranas espermáticas. Pois, o poder crioprotetor do LDL, é relacionado principalmente à sua aderência na membrana plasmática dos espermatozoides (GRAHAM AND FOOTE 1987, BERGERON, CRETE *et al.* 2004), e formação de interface entre ácidos graxos e água (ANTON, MARTINET *et al.* 2003). Além de, promover a entrada de fosfolipídios e colesterol na membrana celular (BERGERON, CRETE *et al.* 2004), formar complexos com proteínas do plasma seminal, evitando a ação deletéria destas sobre as membranas (MANJUNATH, NAUC *et al.* 2002).

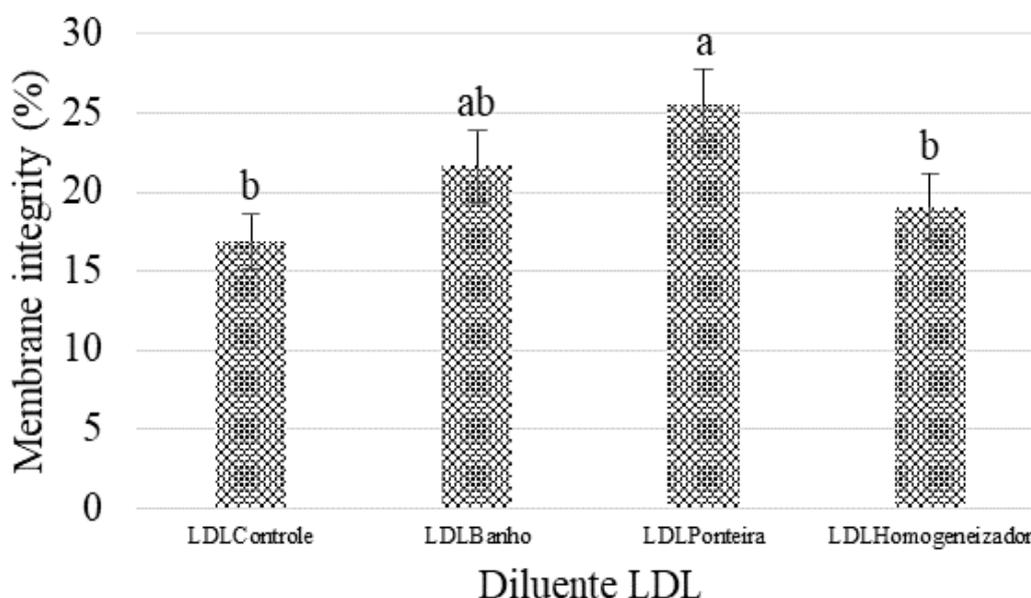


Figura 1. Percentual de integridade de membrana do sêmen canino criopreservado com diferentes nanoemulsões de LDL.

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

4. CONCLUSÕES

A ultrassonicação por meio de ponteira de ultrassom, em diluentes de criopreservação de sêmen (nanoemulsões de LDL), foi benéfico na manutenção da qualidade da membrana espermática no pós-descongelamento de ejaculados caninos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

HEVONOJA, T. et al. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochim Biophys Acta**, v. 1488, n. 3, p. 189-210, Nov 15 2000. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11082530> >.

SKAJAA, T. et al. The biological properties of iron oxide core high-density lipoprotein in experimental atherosclerosis. **Biomaterials**, v. 32, n. 1, p. 206-13, Jan 2011. ISSN 1878-5905 (Electronic) 0142-9612 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926130> >.

HARISA, G. I.; ALANAZI, F. K. Low density lipoprotein bionanoparticles: From cholesterol transport to delivery of anti-cancer drugs. **Saudi Pharm J**, v. 22, n. 6, p. 504-15, Dec 2014. ISSN 1319-0164 (Print) 1319-0164 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25561862> >.

MOUSSA, M. et al. Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695-706, Apr 01 2002. ISSN 0093-691X (Print) 0093-691X (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12035979> >.

PRAPAIWAN, N. et al. Low-density Lipoprotein Improves Motility and Plasma Membrane Integrity of Cryopreserved Canine Epididymal Spermatozoa. **Asian-Australas J Anim Sci**, v. 29, n. 5, p. 646-51, May 2016. ISSN 1011-2367 (Print) 1011-2367 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26954170> >.

BERNARDI, G.; COOK, W. An electrophoretic and ultracentrifugal study on the proteins of the high density fraction of egg yolk. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 44, p. 86-96, 1960

CHAU, C.; WU, S.; YEN, G. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

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

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

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 1, p. 62-76, Mar 2011. ISSN 1530-9932 (Electronic)
1530-9932 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21174180> >.

GRAHAM, J. K.; FOOTE, R. H. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42-52, Feb 1987. ISSN 0011-2240 (Print)
0011-2240 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3816287> >.

BERGERON, A. et al. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biol Reprod**, v. 70, n. 3, p. 708-17, Mar 2004. ISSN 0006-3363 (Print)
0006-3363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613896> >.

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

MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biol Reprod**, v. 67, n. 4, p. 1250-8, Oct 2002. ISSN 0006-3363 (Print)
0006-3363 (Linking). Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12297543> >.