



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS APÓS EXPOSIÇÃO A
NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS COM DMSA**

DENISE FERREIRA CALDEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA-DF
JULHO/2011**



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS APÓS EXPOSIÇÃO A
NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS COM DMSA**

Aluna: Denise Ferreira Caldeira

Orientadora: Prof. Dr^a Carolina Madeira Lucci

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 048/2011

**BRASÍLIA-DF
ABRIL DE 2011**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CALDEIRA, D. F. **Viabilidade dos espermatozoides bovinos após exposição a nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 75 p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando a reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e orientador reservam para si outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor e seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

CALDEIRA, Denise Ferreira. **Viabilidade dos espermatozoides bovinos após exposição a nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2011, 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais). - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2011.

1 Biotecnologia. 2 Toxicidade. 3 Espermatozóide.
4 Nanotecnologia I. Lucci, C. M. II. PhD

CDD ou CDU

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS APÓS EXPOSIÇÃO A
NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS COM DMSA**

DENISE FERREIRA CALDEIRA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE
EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

APROVADA POR:

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Prof. Dr^a. (UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA/UnB)
ORIENTADORA**

**MARIA LUIZA FASCINELI, Dr^a.(UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA/UnB)
EXAMINADOR**

**JOÃO PAULO FIGUEIRÓ LONGO, Dr. (EMPRESA NANODYNAMICA)
EXAMINADOR**

BRASÍLIA/DF, 07 DE JULHO DE 2011.

*Cada um de nós compõe a
sua história e cada ser em si
carrega o dom de ser capaz,
de ser feliz.*

Renato Teixeira e Almir
Sater

AGRADECIMENTOS

À Deus, sempre em primeiro lugar, por colocar as oportunidades no nosso caminho e por dar a força para conseguirmos alcançar os objetivos;

À minha orientadora, Prof.^a Carolina Lucci, por todo o conhecimento e paciência investidos em mim ao longo desse mestrado. Sem o apoio e orientação seria muito difícil chegar até aqui. Um exemplo de profissional que tive o orgulho de ter ao meu lado como orientadora e amiga.

A minha mãe, Marina, por suas orações para que tudo desse certo, pelo apoio durante todas as etapas desta caminhada. Uma mulher guerreira que tenho como exemplo de vida.

Ao meu pai, Wilton, por ter acreditado no meu potencial e investido no meu futuro. Agora colho os frutos que ele me ajudou a plantar, com muito amor e carinho.

As minhas irmãs, Fabi, Jaque e Kaka, que da forma delas me apoiaram nesta caminhada (me chamando de nerds todos os dias) e sempre estiveram ao meu lado. Ao meu cunhado e irmão, André, uma pessoa muito especial e impar que admiro bastante.

Ao Rafael, amigo e sempre companheiro, sempre me mostrando como superar os desafios e vencer os obstáculos. Era sempre muito bom ouvir: Vai dar tudo certo.

À Bê por me apoiar e sempre estar ao meu lado com sua amizade.

Às amigas Ericat e Dani pelo apoio e companheirismo, por puxarem minha orelha quando eu estava desviando o foco. Por estarem ao meu lado e fazerem parte da minha vida agora.

À amiga Pri pela ajuda com a dissertação. Uma pessoal incrível, com um coração enorme que tenho orgulho de chamar de amiga.

Ao Matchu, um amigo inseparável, um coração puro que tenho certeza que estará sempre comigo.

Ao CICLO: Fê, Japs e Mari, que mesmo afastado, será eterno.

À Fernanda “querida”, por ter ficado nos finais de semana e feriados me ajudando no experimento, mas principalmente pela companhia e conversas divertidas ao longo desse período.

À Renatinha e ao Jivas companheiros de grupo e amigos. Obrigada pela ajuda com a microscopia eletrônica.

À Michelle por me ajudar com a concentração espermática.

Ao Carlos pela ajuda com o CASA e por ter sido um grande companheiro nessa jornada.

A todos os estudantes, técnicos e professores da EMBRAPA CENARGEN que ofereceram a estrutura laboratorial para a realização deste experimento. Em especial à Dr^a Margot Dode pela ajuda e conselhos no delineamento do experimento.

Não podia deixar de agradecer àqueles que estiveram comigo na primeira fase do mestrado, na FAL. Obrigada: Luciana, Rafael, Stela, Geisa, Rafha, Tiago, Bárbara, Dallago, Adriana, Antonio e a todos os demais estagiários, funcionários e professores do CMO.

À Prof^a Connie pela ajuda com as avaliações estatísticas.

À Dr^a Maria Luiza pelos conselhos para delinear o experimento e à Juliana pela ajuda com as nanopartículas.

Ao Prof^o Ricardo por não ter perdido a paciência com as minhas visitas incomodas de finais de semana para fazer a Chefia me ajudar com a dissertação.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram com a finalização deste projeto. MUITO OBRIGADA.

ÍNDICE

RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1.....	12
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Problemática e relevância	2
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Nanotecnologia	3
2.2 Nanopartículas magnéticas	4
2.2.1 Utilização de nanopartículas magnéticas na reprodução assistida	6
2.2.2 Aplicações biomédicas das NPM	8
2.2.3 Citotoxicidade das NPM	12
2.2 Características estruturais e funcionais do sêmen bovino.....	14
2.2.1 Avaliação da cinética e função espermática.....	16
2.2.2 Avaliação ultraestrutural da célula espermática.....	22
3. OBJETIVOS	24
Objetivo geral.....	24
Objetivos específicos.....	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 2.....	35
VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS APÓS EXPOSIÇÃO ÀS NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS COM DMSA	35

1. RESUMO	36
2. ABSTRACT	37
3. INTRODUÇÃO	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
4.1 Amostras de sêmen.....	40
4.2 Obtenção do fluido magnético	40
4.3 Processamento do sêmen.....	41
4.4 Tratamentos	41
4.5 Avaliação da cinética e resistência espermática.....	42
4.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática e integridade acrossomal	43
4.7 Avaliação da incorporação das NPM e da ultraestrutura espermática	45
4.8 Avaliação estatística.....	45
5. RESULTADOS.....	46
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	62
7.1 Considerações finais	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

RESUMO

VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS APÓS EXPOSIÇÃO A NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS COM DMSA

A utilização de nanopartículas magnéticas no sêmen permite o incremento de técnicas de reprodução assistida para a realização transgênese e seleção espermática. Para tanto, é importante conhecer o comportamento da celular espermática em contato com as nanopartículas magnéticas para que possam ser utilizadas em larga escala nas diferentes biotécnicas da reprodução. A resposta espermática após contato com fluido magnético contendo nanopartículas de maghemita recoberta com DMSA foi avaliada com o intuito de determinar a toxicidade do nanomaterial. Sêmen bovino descongelado, após passagem pelo gradiente de *Percoll*, foi incubado a 37,5 °C em meio SP-TALP+ (BSA 1,5%) adicionado de fluido magnético (FM) com concentrações finais de 0,06, 0,03 e 0,015 mg de Fe/mL. O grupo controle, sem adição de FM, foi incubado apenas com meio SP-TALP+. Durante a incubação avaliou-se a cinética espermática através do sistema CASA a cada 15 minutos durante duas horas, bem como na terceira e quarta horas de incubação. No início da incubação (zero hora), na segunda e na quarta horas também foram avaliadas a integridade da membrana plasmática e a reação acrossomal por meio da associação de corantes fluorescentes (iodeto de propídio e FITC-PNA). Ao final do período de incubação, o sêmen remanescente de cada tratamento foi fixado para análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET). Observou-se que para os parâmetros do CASA, integridade da membrana e reação acrossomal não houve influencia da nanopartícula na resposta do sêmen ao longo do período de incubação, independente da concentração utilizada. Na análise da MET não foram observados danos ultraestruturais às células espermáticas após contato com o FM. Também não foi observado internalização das nanopartículas em nenhum grupo tratado com FM. Desta forma, o FM contendo nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA pode ser utilizado em contato direto com o sêmen para o incremento das técnicas de reprodução assistida, uma vez que não há alteração na função e estrutura espermática nas condições testadas.

Palavras-chave: Biotecnologia; Toxicidade; Espermatozoide; Nanotecnologia

ABSTRACT

VIABILITY OF BULL SPERMATOZOA AFTER EXPOSURE TO MAGHEMITE NANOPARTICLE COATED WITH DMSA

The use of magnetic nanoparticles in semen allows the improvement of assisted reproduction techniques to achieve transgenesis and sperm selection. Therefore, it is important to know the sperm cell behavior after exposure to magnetic nanoparticles, to achieve their use in different biotechnologies of reproduction in large scale. The sperm response after exposure to magnetic fluid containing maghemite nanoparticles coated with DMSA was evaluated in order to determine the toxicity of the nanomaterial. After passage through the Percoll gradient, frozen-thawed bull semen was incubated at 37.5 °C in SP-TALP+ medium (1.5% BSA) added to the magnetic fluid (MF) with final concentrations of 0.06, 0.03 and 0.015 mg Fe/mL. The control group, without MF, was just incubated with SP-TALP+ medium. During incubation the sperm kinetic pattern was assessed using CASA system, the assessments were performed every 15 minutes during two hours, as well as in the third and fourth hours of incubation. At the beginning of the incubation (hour zero), as well as in the second and fourth hours the sperm plasma membrane integrity and acrosome reaction were evaluated through the combination of fluorescent dyes (propidium iodide and FITC-PNA). In the ETM analysis, sperm cells ultrastructural damage were not observed after exposure to the MF. The uptake of nanoparticles by the spermatozoa was also not observed in any group treated with MF. Thus, the MF containing maghemite nanoparticles coated with DMSA can be used in semen in order to improve the assisted reproduction techniques, since there is no change in sperm function and structure under the conditions tested.

Key-Words: Biotechnology; Toxicity; Sperm; Nanotechnology

CAPÍTULO 1
CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia utiliza a ciência em escala nanométrica permitindo, desta forma, a manipulação de átomos e moléculas para a construção de materiais. Para serem classificados como nano, os materiais devem apresentar dimensões entre 0,1 e 100 nanômetros – nm (Morales, 2007). Nessa escala os nanomateriais apresentam características físicas e químicas peculiares, como tolerância à temperatura, variação de cor, alterações da reatividade química e da condutividade elétrica que não são observadas no mesmo material em escala normal. Estas peculiaridades explicam o interesse tecnológico em relação aos nanomateriais, que já são fabricados em escala para emprego em cosméticos, tintas, revestimentos, tecidos, catalisadores ou para proporcionar maior resistência aos materiais (Peterson, 2004; Cattien, 2007; Sahu & Casciano, 2009).

As nanopartículas magnéticas (NPM), devido ao tamanho e capacidade de resposta a um campo magnético externo, são especialmente estudadas para aplicações biológicas (Sung et al. 1994; Berry & Curtis, 2003). Na reprodução assistida em humanos e animais essas NPM já são relatadas para utilização em técnicas de seleção espermática (Dirican et al., 2008) e na transfecção de genes guiada por espermatozoide (Kim et al., 2010). Além disso, as nanopartículas magnéticas são bastante empregadas na medicina terapêutica e diagnóstica, através da sua utilização na veiculação de drogas para tratamento de inúmeras doenças e como potentes agentes de contraste em equipamentos de ressonância magnética. As NPM podem, ainda, auxiliar no isolamento de células, proteínas e outros compostos através do emprego de um campo magnético que atrai as nanopartículas ligadas a estruturas de interesse para o isolamento (Gao et al. 2009).

Com o crescimento da utilização e do interesse pelas nanopartículas na biologia, estudos de toxicidade *in vivo* e *in vitro* são delineados para determinar os efeitos das NPM em células e modelos animais (Soenen & De Cuyper, 2009). Até o momento, os efeitos das nanopartículas magnéticas sobre a cinética e morfologia espermática não são bem conhecidos. Este dado pode ser de grande importância para que a nanotecnologia possa ser aplicada em larga escala nas técnicas de reprodução assistida.

1.1 Problemática e relevância

A nanotecnologia já é considerada como uma das mais promissoras tecnologias dos últimos tempos, por isso vultosos investimentos estão sendo aplicados em pesquisas para o seu desenvolvimento e utilização em larga escala. Estima-se que para os próximos anos cerca de um trilhão de dólares serão investidos em nanotecnologia. Desde 2004, o setor biomédico e de ciências da vida apresentam os maiores índices de desenvolvimento com nanotecnologia, comparado a outros setores como eletrônica, transporte e energia (Zanetti-Ramos & Creczynski-Pasa, 2008). Destaca-se nos estudos com nanobiotecnologia a vetorização de fármacos, que objetiva o deslocamento de fármacos a órgãos específicos através da utilização de nanomateriais. Além disso, a nanotecnologia também é uma promessa para outras áreas da biologia e da medicina, através da utilização de nanopartículas como contrastes em equipamentos de ressonância magnética, em técnicas de isolamento celular, entre outros (Gao et al., 2009). Dentre os nanomateriais para utilização na biomedicina, destacam-se as nanopartículas magnéticas devido, principalmente, à possibilidade de manipulação após aplicação de um campo magnético externo (Sung et al. 1994; Berry & Curtis, 2003).

A utilização de nanopartículas magnéticas também é uma realidade em técnicas de reprodução assistida, para a realização de transgênese e separação espermática, demonstrando que biotécnicas reprodutivas podem dispor dessa inovadora tecnologia, por meio da utilização das nanopartículas nos espermatozoides (Dirican et al., 2008, Kim et al., 2010). Com isso, torna-se importante conhecer o comportamento da célula espermática em contato com as nanopartículas magnéticas, para que possa ser aplicada em larga escala nas técnicas de reprodução assistida.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Nanotecnologia

O termo “nano” tem origem grega e significa “anão”, portanto o prefixo da palavra nanotecnologia caracteriza uma ciência que lida com materiais em uma escala muito pequena. De fato, essa tecnologia estuda, cria e manipula estruturas menores que 100 nanômetros (Morales, 2007), sendo que 1nanômetro corresponde a 10^{-9} metros, ou seja, a bilionésima parte do metro (Figura 1) (Cattien, 2007).

A ideia de trabalhar as estruturas em uma escala menor que a obtida pela microscopia óptica foi proposta pela primeira vez pelo físico Richard Feynman em 1959. Na ocasião de seu discurso, uma palestra intitulada “Há muito espaço lá embaixo”, Feynman proferiu sobre um futuro em que seria possível a manipulação de átomos para a construção de materiais (Peterson, 2004). Somente em 1974, na Universidade de Ciência de Tóquio, o termo “nanotecnologia” foi utilizado para designar a ciência que estuda objetos e processos na escala do nanômetro. Na década de 80, com o advento do microscópio de varredura por tunelamento e do microscópio de força atômica, foi então possível visualizar e manusear átomos, tornando a então ideia futurística de Feynman uma realidade para a ciência moderna (Cadioli & Salla, 2006).

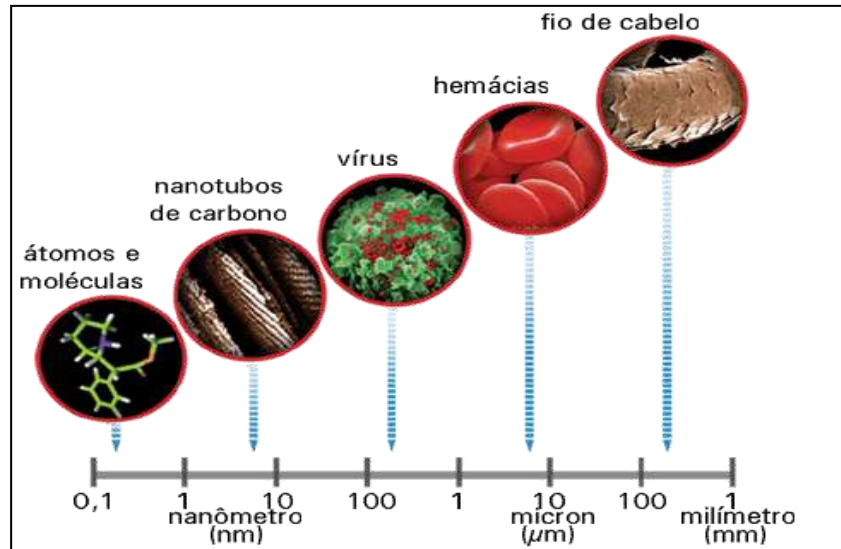


Figura 1 Dimensões representativas de algumas estruturas típicas, em suas várias escalas. (Um nanotubo de carbono é dez mil vezes mais fino do que um fio de cabelo) (Fonte: http://www.ofitexto.com.br/conteudo/deg_230778.htm).

Atualmente, muitos investimentos vêm sendo aplicados para o desenvolvimento e aprimoramento da nanotecnologia. A utilização comercial atinge, principalmente, os ramos da engenharia de produtos eletrônicos, da indústria automobilística, da construção civil, dos cosméticos, de roupas e artigos esportivos, através do desenvolvimento de materiais utilizando a nanotecnologia para a produção. Além disso, pesquisas envolvendo a aplicação da nanotecnologia na biomedicina apresentam resultados promissores principalmente em técnicas de vetorização de fármacos, diagnóstico precoce de doenças, tratamento de câncer e isolamento celular (Peterson, 2004; Cattien, 2007).

2.2 Nanopartículas magnéticas

A produção de nanomateriais é a principal responsável pela difusão e utilização da nanotecnologia. Os nanomateriais podem ser produzidos utilizando processos físicos e químicos que permitem que átomos e moléculas sejam manipulados e rearranjados (Ashby et al., 2009). A redução dos materiais à escala nanométrica proporciona alterações físicas e químicas no material, conferindo-lhe novas propriedades (Lacava, 2009).

Existem vários tipos de nanomateriais, como nanopartículas, nanofios, nanotubos, nanocristais, nanoplacas, entre outros, que já são aplicados nas mais diversas áreas do conhecimento (Ashby et al., 2009). Na biomedicina, destaca-se a utilização das nanopartículas. Esse nanomaterial apresenta alta reatividade e propriedades especiais exclusivas que não são observadas nos materiais em estado natural (Hosokawa et al., 2007). As nanopartículas podem ser oriundas dos mais diversos materiais, no entanto, na biomedicina, aquelas produzidas por metais e óxidos metálicos apresentam peculiares características de interesse. Por exemplo, nanopartículas de ouro apresentam colorações diversas do ouro em estado natural. De acordo com o tamanho, formato, estado de agregação ou mesmo o ambiente em que a partícula está empregada, pode-se conseguir brilho intenso e/ou colorações como vermelho, azul e roxo (Murphy et al., 2008). Curiosamente, nas civilizações mais antigas as nanopartículas de ouro e de outros metais nobres já eram utilizadas como pigmentos em vidros de capelas para conferir cores ao material, no entanto não se sabia que se tratava de nanopartículas (Ashby et al., 2009). Atualmente, as nanopartículas de ouro são empregadas desde a produção de maquiagens (Durán et al., 2010) até em técnicas de diagnóstico por imagem de tumores ainda em estágio inicial (Murphy et al., 2008). No caso das nanopartículas de ouro, observa-se uma alteração na propriedade óptica da partícula. Adicionalmente, nanopartículas produzidas a partir de metais como cobalto, níquel, zinco e ferro ou óxidos metálicos como óxido de zinco, óxido de ferro e óxido de titânio, apresentam modificações na propriedade magnética do material. Por isso, são classificadas como nanopartículas magnéticas (NPM).

As NPM a base de óxido de ferro, denominadas nanopartículas de magnetita ou maghemita (estado oxidado), são classificadas como superparamagnéticas. Essa propriedade é alcançada apenas na escala nano e, basicamente, é a capacidade que a partícula tem de se magnetizar na presença de um campo magnético (Sung et al., 1994; Berry & Curtis, 2003). Em outras palavras, essa característica permite que a NPM seja manipulada utilizando-se um campo magnético externo (Figura 2). Além disso, o superparamagnetismo permite que as NPM dissipem calor quando submetidas a um campo magnético alternado (Lacava, 2009).

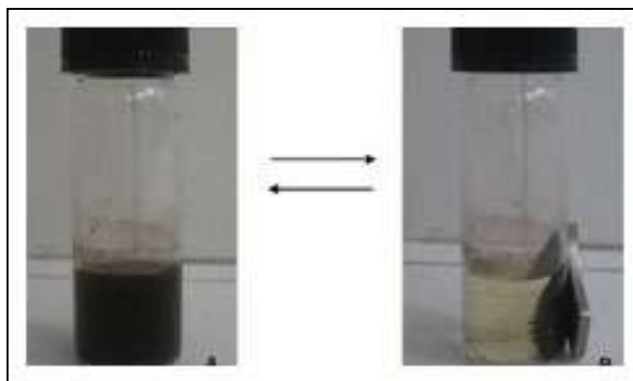


Figura 2 Comportamento superparamagnético das NPM na ausência ou presença de um campo magnético externo (Fonte: http://www.guiasweb.com.br/noticia_3372-nanopartícula_libera_medicamento_direto_na_celula_cancerosa.htm Acesso em 16/03/2011).

As NPM, no entanto, tendem a se aglomerar com facilidade devido à força de atração exercida pelas partículas (Rabias et al., 2008). Essa aglomeração é irreversível e não desejável, uma vez que quando aglomeradas as NPM podem perder características e funcionalidade (Thüneman et al., 2006). A utilização das NPM dispersas em fluidos magnéticos (FM) é uma forma de manter as nanopartículas em suspensão, evitando assim, a aglomeração e precipitação. Os FM são sistemas coloidais resultantes da combinação de uma fase dispersa, sólida, constituída por nanopartículas magnéticas, uniformemente distribuída em uma fase dispersante, líquida, de natureza polar (água) ou apolar (hexano, benzeno, óleos minerais) e são a forma mais comum de utilizar as NPM em sistemas biológicos (Morais, 2009).

2.2.1 Utilização de nanopartículas magnéticas na reprodução assistida

As técnicas de reprodução assistida como inseminação artificial, produção *in vitro* de embriões, injeção intracitoplasmática de espermatozoide, clonagem, transgênese, entre outras, podem ser uma ferramenta para o incremento da fertilidade em humanos subférteis e para o melhoramento genético de animais. A utilização de nanopartículas magnéticas tem sido relatada como forma de auxiliar algumas etapas das biotécnicas da

reprodução, tais como a separação espermática (Dirican et al., 2008) e a transfecção de genes guiada por espermatozoide para a produção de animais transgênicos (Kim et al., 2010).

A separação espermática é empregada na reprodução assistida de humanos subfêrteis, principalmente na prática de injeção intracitoplasmática de espermatozoide e na fertilização *in vitro*, com o objetivo de melhorar as taxas de gestação (Dirican et al., 2008). A técnica visa ao isolamento de espermatozoides em estágio de apoptose presentes no sêmen, que pode ser a causa de baixa fertilidade devido a falhas na eliminação destas células antes da ejaculação (Anzar et al., 2002). O processo de apoptose promove alteração na membrana plasmática (MP) do espermatozoide para sinalizar o processo de autodestruição (Shen et al., 2002). Com o uso de uma proteína de alta afinidade acoplada a estruturas magnéticas é possível identificar, ligar e isolar os espermatozoides em apoptose através do uso de um campo magnético externo (Said et al., 2006). Dirican et al. (2008) utilizaram micropartículas magnéticas para isolar espermatozoide em estágio de apoptose e observaram melhoras nas taxas de gestação em humanos após a injeção intracitoplasmática de espermatozoide. Estes autores também sugerem a utilização das nanopartículas magnéticas com o mesmo objetivo.

A transgênese, por sua vez, é uma técnica que consiste na transferência de um gene exógeno para um embrião com o intuito de modificar o genoma do organismo. Com a técnica é possível obter melhora no desempenho reprodutivo, na conversão alimentar, na produção de leite e carne, aumentar a resistência a doenças, além da liberação de fármacos pelo leite. O carreamento do DNA exógeno ao embrião pode ser feito, dentre outras formas, através do espermatozoide durante a fecundação. Basicamente, o espermatozoide se liga ao gene após incubação com DNA exógeno e é utilizado em sistema de fecundação *in vitro* (Wheeler et al., 2001). Essa ligação ocorre porque espermatozoides têm afinidade por segmento de DNA, devido à presença de proteínas de ligação de DNA presentes na cabeça do espermatozoide, no entanto, os resultados na obtenção de animais transgênicos com esta forma de apresentação do DNA ainda são limitados (Zani et al., 1995). A utilização de nanopartículas magnéticas tem sido relatada como forma de incrementar a aplicação da técnica. Embriões de porcos transgênicos foram produzidos através da utilização de NPM acoplada ao DNA exógeno que se ligaram ao espermatozoide após aplicação de um campo magnético. Os espermatozoides, após fecundação *in vitro*, carregaram o DNA exógeno ao embrião, demonstrando que as NPM podem auxiliar na transgênese mediada por espermatozoide, facilitando a técnica e reduzindo os custos de produção (Kim et al., 2010).

Como visto, as NPM vêm sendo utilizadas para o incremento das técnicas de reprodução assistida através da sua utilização direta no sêmen. Desta forma, deve-se investigar se há alguma alteração nas características espermáticas após o contato direto com as NPM para que sua aplicação possa ser estendida às demais biotécnicas da reprodução. No entanto, poucos são os estudos que relacionam os efeitos da exposição dos espermatozoides às nanopartículas.

A utilização de nanopartículas de ouro em contato com o espermatozoide humano foi o primeiro estudo *in vitro* relacionado a esse tipo celular. Observou-se que a adição de solução de nanopartículas de ouro em uma amostra de sêmen foi suficiente para decréscimo de 25% da motilidade da amostra após 15 minutos de exposição direta; o grupo controle conservou a motilidade em torno de 95%. Além disso, houve internalização das NPM pelo espermatozoide principalmente na região da cabeça e cauda (Wiwanitkit et al., 2007). Outro estudo utilizou sêmen bovino incubado com NPM de maghemita recobertas com PVA em uma concentração final de Fe de 7,35 mM. Foram avaliadas a motilidade, a internalização de NPM e a capacidade de reação acrossomal (RA). A motilidade espermática foi mantida em torno de 70% durante toda a incubação, além disso, não houve comprometimento da capacidade de reagir o acrossoma. A internalização das nanopartículas pelo espermatozoide ocorreu em função do tempo de incubação e observou-se que a maioria das partículas estava disposta na superfície dos espermatozoides (Makhluf et al., 2006). Apesar dos estudos, pouco se conhece acerca do comportamento estrutural e funcional da célula espermática após o contato com as NPM. Além disso, esses estudos não permitem uma relação dos resultados com a utilização das nanopartículas na reprodução assistida.

2.2.2 Aplicações biomédicas das NPM

Estudos na área biomédica têm sido desenvolvidos para a aplicação terapêutica e diagnóstica das NPM. Isso porque as NPM, devido ao tamanho e propriedades, podem ser utilizadas como vetores para o transporte de fármacos; como potentes agentes de contraste nos equipamentos de ressonância magnética; nas técnicas de separação celular; no isolamento de

toxinas; na detecção de anticorpos e bactérias no sangue e ainda no tratamento de câncer por hipertermia (Gao et al. 2009).

Para serem utilizadas com este objetivo as NPM devem interagir com alvos biológicos de forma específica, atravessar barreiras e membranas sem causar danos às células saudáveis e não ser eliminada do organismo antes de sua atuação. Desta forma, as nanopartículas precisam estar recobertas e associadas com material biologicamente ativo para se tornarem biocompatíveis (Salata, 2004). A cobertura biológica da nanopartícula pode proporcionar, ainda, especificidade da partícula por determinada célula, órgão ou estrutura. Assim, a conjugação das nanopartículas magnéticas a moléculas ou composto orgânicos origina uma estrutura com duas importantes propriedades: especificidade por um sítio de ligação e capacidade de responder a um campo magnético externo (Gao et al., 2009). Além disso, o revestimento previne também a aglomeração das nanopartículas magnéticas, permitindo sua dispersão em FM, mantendo as NPM estáveis para utilização em meios biológicos (Moraes, 2009). As NPM podem estar conjugadas a estruturas moleculares, tais como proteínas, receptores, antígenos, entre outros, além de compostos orgânicos como DMSA, dextran, citrato e rodamina (Mahmoudi et al., 2009). O revestimento também pode prevenir os possíveis efeitos tóxicos da partícula no organismo. Estudos demonstram que a cobertura de DMSA protege a célula dos efeitos citotóxicos das nanopartículas, favorecendo a sua utilização em meios biológicos (Auffan et al., 2006; Valois et al., 2010; Braz, 2011). Essas diferentes características conferidas à nanopartículas após o revestimento biológico permitem sua utilização na biomedicina tanto *in vivo* quanto *in vitro*.

O isolamento bacteriano para fins de diagnóstico pode ser alcançado *in vitro* através da associação de NPM a vancomicina, um antibiótico. Esse nanocomposto quando adicionado a uma cultura mista de bactérias gram-positivas e enterococos, mesmo em baixas concentrações, se ligam aos enterococos, devido à presença de sítios de ligação de vancomicina nesse tipo de bactéria. O conjunto NPM-bactéria, quando submetido a um campo magnético, é atraído, isolado e identificado (Gu et al., 2003). O isolamento de bactéria na clínica médica é difícil e demanda tempo, pois requer multiplicação e identificação do microorganismo suspeito em um meio de cultura específico. No entanto, pode ser uma ferramenta muito importante para o diagnóstico clínico e para definir o tratamento. Quando em estágio inicial da doença, a população bacteriana circulante é menor, dificultando ainda mais a detecção do agente por meio de cultura. Portanto, os resultados apresentados por Gu et al. (2003) demonstram que é possível o isolamento e identificação de microorganismo,

mesmo em baixas concentrações, associando NPM a estruturas orgânicas com especificidade ao microorganismo suspeito.

A associação de NPM a biomoléculas funcionais também pode ser útil na purificação de proteínas, material genético, organelas e células (Gao et al., 2009). A produção de NPM com terminações protéicas permite o isolamento preciso de aminoácidos e proteínas sem a necessidade prévia de promover lise celular, devido à especificidade do nanocomposto que permite a ligação do aminoácido ou proteína à terminação evitando a ligação de outras substâncias não específicas (Xu, et al., 2004a,b). A nanotecnologia também pode auxiliar a remoção de toxinas do organismo. A utilização de biofosfato ligado à nanopartícula de magnetita permitiu a retirada de 69% dos íons de urânio presentes em amostras de sangue contaminado (Wang et al., 2006). A utilização de NMP conjugada a outros nanocompostos permite a formação de nanoestruturas funcionais e manipuláveis. Por exemplo, a utilização de pontos quânticos (“quantum dots”), um corante de potente capacidade fluorescente, associados às NPM confere a nanoestrutura formada fluorescência e magnetismo (Berry & Curtis, 2003; Tartaj et al., 2003). Utilizando campo magnético externo foi possível manipular o nanocomposto em meio intracelular monitorando o movimento através do uso de microscópio confocal, demonstrando a possibilidade de manipulação intracelular de moléculas associadas às NPM sem danos à estrutura da célula (Gao et al., 2008).

As nanopartículas magnéticas também são utilizadas como agente de contraste na formação de imagens em equipamentos de ressonância magnética (RM), permitindo a diferenciação dos tecidos saudáveis e lesados (Gupta & Gupta, 2005a). A utilização desta técnica de diagnóstico é muito importante para identificação precoce de tumores e células metastáticas. Células tumorais apresentam alterações estruturais que são identificadas por determinadas moléculas de ligação. Quando essas moléculas estão conjugadas com nanopartículas magnéticas, elas se ligam aos tumores e metástases, permitindo um contraste preciso da região quando submetido à RM. Da mesma forma, é possível delimitar e determinar as regiões acometidas, mesmo em estágio inicial da multiplicação tumoral. Assim, o diagnóstico clínico é mais preciso, permitindo um tratamento mais direcionado (Ito et al., 2005). Além disso, as NPM podem ser utilizadas como agentes de contraste para detectar tecido em estágio de apoptose, frequentes em doenças neurodegenerativas, isquemias e tumores (Thompson, 1995). O mecanismo é o mesmo da detecção de células tumorais, no entanto, utiliza-se NPM associadas a moléculas de ligação específicas de receptores de membrana plasmática de célula apoptótica (Francis et al., 1997). A utilização de NPM em

equipamentos de RM permite a detecção de tecido em apoptose ainda em estágio inicial, possibilitando um diagnóstico precoce da doença. Quando comparados a outros métodos de diagnóstico, a utilização de NPM como agente de contraste apresenta a vantagem de melhor resolução e delimitação das regiões acometidas, devido à alta sensibilidade dos equipamentos de RM às NPM (Nunn et al., 1996).

Uma das mais importantes aplicações da nanotecnologia no ramo da biomedicina é a utilização de nanopartículas magnéticas para vetorizar fármacos para tecidos e órgãos específicos (Neuberger et al., 2005). A técnica pode reduzir a dose necessária do medicamento, os efeitos colaterais e o custo do tratamento de doenças (Gupta & Gupta, 2005a). Nesse caso, propriedades como a carga, característica química da superfície e tamanho da NPM são bastante relevantes, pois podem afetar a circulação sanguínea do nanocomposto e sua biodisponibilidade (Chouly et al., 1996), tais fatores estão associados com a ação do fármaco no organismo. A vetorização de anticancerígenos assume maior interesse, pois esse tipo de fármaco, geralmente aplicado sistematicamente, é distribuído no organismo de forma inespecífica causando danos às células saudáveis e gerando resultados ineficazes ao tratamento do câncer. A utilização de NPM associadas aos quimioterápicos em estruturas biocompatíveis, bem como a resposta desses nanocompostos a campos magnéticos externos, gera uma estrutura de ação específica capaz de carrear o fármaco e promover a sua liberação de forma controlada. Desta forma, tem-se a redução da dose necessária do quimioterápico e, conseqüentemente, de seus efeitos colaterais (Cho et al., 2008; Gupta & Gupta, 2005a).

A utilização de NPM no tratamento de tumores malignos através da magnetohipertermia é outra importante vertente de estudos utilizando nanobiotecnologia. A hipertermia é um tratamento convencional do câncer que se baseia em proporcionar um aumento de temperatura na região do corpo acometida por uma neoplasia. A temperatura alta promove lise da célula tumoral, que é mais sensível, sem afetar as células saudáveis (Castro et al., 2010). As células tumorais podem ser destruídas em temperaturas acima de 40°C, enquanto as células normais suportam temperaturas ainda mais elevadas (Gupta & Gupta, 2005a). Esse procedimento também pode ser realizado através do uso de NPM pelo processo denominado magnetotermocitólise (Tartaj et al., 2003). A técnica consiste na aplicação de um campo magnético alternado que promove aquecimento das NPM (Castro et al., 2010). Esse aquecimento vai depender da natureza magnética da NPM bem como da potência do campo magnético e da capacidade de resfriamento do fluxo sanguíneo na região do tumor. Estudos

com magnetotermocitólise demonstram que a utilização NPM de magnetitas injetadas diretamente em tumores de língua de hamster inibe a proliferação da neoplasia e reduz a quantidade de células tumorais (Wada et al., 2003).

2.2.3 Citotoxicidade das NPM

Os benefícios propostos com a utilização das nanopartículas magnéticas na biomedicina são indiscutíveis. Desta forma, estudos de toxicidade são importantes para avaliar e mensurar o comportamento das estruturas quando em contato com esse nanomaterial. As NPM, devido ao seu tamanho, são capazes de atravessar membranas biológicas, podendo afetar o metabolismo celular (Brooking et al., 2001). O comportamento das estruturas biológicas à exposição às NPM diverge, principalmente, devido às características das nanopartículas utilizadas nos estudos, tais como tamanho inicial, estado de aglomeração, carga, forma, revestimento orgânico e área de superfície que interferem na resposta das estruturas biológicas à exposição ao nanomaterial, dificultando a comparação dos resultados mesmo com partículas semelhantes (Mahmoudi et al., 2009; Soenen & De Cuyper, 2009).

Diversos trabalhos avaliam os efeitos das NPM com o intuito de conhecer a resposta tecidual e celular após a exposição a esta nanopartícula. Por exemplo, a utilização de NPM para veiculação de drogas por via endovenosa expõe as células sanguíneas aos efeitos desse nanomaterial. Estudos *in vitro* simulam esse contato para estimar o comportamento das células sanguíneas na presença das nanopartículas magnéticas. Em estudos com eritrócitos humanos incubados com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro recobertas com citrato, dendrímero ou sem revestimento orgânico, não houve alteração do conteúdo intracelular de cálcio, mas foi observado redução do pH celular independente da presença ou ausência e do tipo de cobertura utilizada. Essa redução pode estar associada à adesão das nanopartículas na superfície das hemácias, afetando as proteínas de membrana responsáveis pelo controle do pH intracelular. O pH intracelular é importante para a atividade celular, como o transporte de íons e moléculas, entre outros (Moersdorf et al., 2010). Nanopartículas de magnetita recobertas com ácido cítrico ocasionaram hemólise em estudos com eritrócitos de cães e equinos

(Creanga et al., 2009), mas não em células de humanos (Moersdorf et al., 2010). Essa diferença na resposta pode estar associada à cobertura orgânica utilizada nas nanopartículas. Outro tipo celular presente na corrente sanguínea são os macrófagos, responsáveis pelo sistema de defesa do organismo. As linhagens de macrófagos de ratos e humanos apresentaram redução da viabilidade celular após contato *in vitro* com NPM de ferro recobertas com DMSA e dextran (Sestier et al., 2002). No entanto, macrófagos provenientes de conteúdo broncoalveolar, liberados após extravasamento promovido por NPM de magnetita recobertas com DMSA, mesmo internalizando as nanopartículas por endocitose, não sofreram alteração na sua estrutura morfológica e funcional. A variação na linhagem dos macrófagos pode ter relação com os diferentes resultados dos estudos (Valois et al., 2010).

Nanopartículas magnéticas de magnetita quando aplicadas *in vivo* apresentam a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) (Wang et al., 2010). A BHE tem a função principal de proteger o sistema nervoso central de agentes nocivos que possam estar presentes na corrente sanguínea. Quando as nanopartículas atravessam essa barreira, entram em contato direto com o sistema nervoso central, em especial com as células neurais. A resposta *in vitro* em células PC12 (linhagem celular de feocromocitoma, semelhantes aos neurônios em fase de diferenciação) após incubação com NPM de magnetita recobertas com DMSA pode ser um indicativo da reação dos neurônios ao contato direto com as NPM. Mesmo em baixas concentrações de nanopartículas houve danos à estrutura do citoesqueleto e redução da viabilidade das células PC12, proporcional ao aumento da concentração de nanopartículas magnéticas. Além disso, a resposta ao fator de crescimento neuronal (GFN), que estimula a formação de axônios, foi prejudicada nas células incubadas com as nanopartículas, enquanto o grupo controle apresentou padrão de desenvolvimento normal, com formação de axônios maduros em quantidade e tamanhos esperados. As células PC12 com NPM internalizadas demonstraram menor padrão de desenvolvimento celular, mantendo praticamente a estrutura esférica da célula inicial. Uma importante característica dos neurônios é a capacidade de os axônios se ramificarem para estabelecer contato com outros neurônios, o que é essencial para as conexões neuromusculares e sinapses, sem essa aptidão as células neurais *in vivo* perdem a funcionalidade. A presença de nanopartículas no citoplasma das células PC12, mesmo em baixas concentrações, reduziu significativamente a capacidade de ramificação dessas células (Pisanic et al., 2007).

Células cultivadas também são usadas em estudo *in vitro* para avaliar os efeitos das nanopartículas. Fibroblasto humano em contato direto com diferentes concentrações de

nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA por 48 horas foram avaliados quanto à resposta cito e genotóxica. Observou-se, através da microscopia eletrônica, internalização das partículas após duas horas de incubação, reduzindo levemente a atividade metabólica das mitocôndrias. No entanto, essa queda na viabilidade celular apresentou efeito transiente, ou seja, não houve alterações significativas de redução da atividade metabólica durante o período de incubação. Esse comportamento deve-se, provavelmente, ao fato de as nanopartículas estarem dentro de vesículas de endocitose, o que protegeu a célula dos efeitos deletérios. Nanopartículas magnéticas em maior concentração promoveram o aumento da atividade metabólica dos fibroblastos, possivelmente devido à formação de aglomerados vesiculares que não permitiram maior contato com os componentes celulares (Limbach et al., 2005). Não foi observado resposta genotóxica dos fibroblastos em contato com as NPM, ou seja, não houve quebras na cadeia de DNA das células, provavelmente por não haver internalização das partículas pelo núcleo celular (Auffan et al., 2006). Nanopartículas recobertas com álcoolpolivinílico (PVA), mesmo em altas concentrações, também não afetou a viabilidade celular de fibroblastos. No entanto, a conformação das células em cultura foi afetada pela exposição às NMP, após observação em microscopia óptica e eletrônica (Mahmoudi et al., 2009).

2.2 Características estruturais e funcionais do sêmen bovino

Um fator determinante para a fecundação e desenvolvimento do embrião é a qualidade espermática que pode ser comprometida devido a injúrias ou defeitos estruturais e funcionais do espermatozoide (Zhang et al., 1998). Apenas espermatozoides intactos são capazes de interagir com o oócito e produzir um embrião (Walters et al, 2004), por isso é importante avaliar a célula espermática em toda a sua estrutura.

O sêmen é a suspensão celular líquida contendo espermatozoides e secreções dos órgãos acessórios do trato genital masculino. Os espermatozoides são produzidos dentro dos túbulos seminíferos dos testículos no processo fisiológico denominado espermatogênese onde ocorrem as divisões e diferenciações das células germinativas primordiais (espermatogônias) em espermatozoides. A espermatogênese pode ser dividida em espermatocitogênese e espermiogênese. Na espermatocitogênese, as espermatogônias passam

por proliferações mitóticas e divisões meióticas formando as células haplóides, denominadas espermátides. Na fase de espermiogênese ocorre o remodelamento celular, com uma série progressiva de modificações estruturais e de desenvolvimento tais como a formação da cauda, condensação da cromatina, desenvolvimento do acrossoma e organização das mitocôndrias. Ao final dessa fase, ocorre a transformação final das espermátides alongadas que são liberadas para os túbulos seminíferos onde perdem grande parte do citoplasma. Ao final da formação, os espermatozoides são liberados para o epidídimo para maturação até que sejam ejaculados. A estrutura final do espermatozoide é toda recoberta com membrana plasmática e é formada por cabeça, contendo o núcleo, e uma cauda com a estrutura necessária para a motilidade espermática (Figura 3). A estrutura e a dimensão dos espermatozoides variam de acordo com a espécie, mas todas têm a mesma função de mover o espermatozoide até o ovócito e assegurar a liberação do material genético para formação de um embrião (Garner & Hafez, 2004).

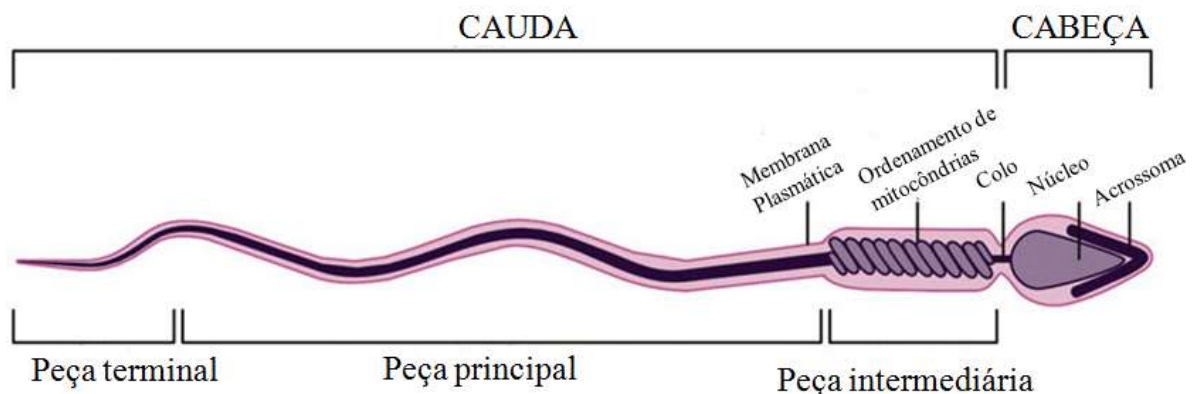


Figura 3 Estrutura final do espermatozoide. (disponível em: http://php.med.unsw.edu.au/embryology/images/e/ee/Mouse-spermatozoa_EM_and_diagram.jpg Acesso em 15/07/2011- modificado)

A cabeça do espermatozoide bovino possui forma arredondada e achatada e é composta por núcleo e acrossoma. O núcleo é formado por uma massa de DNA condensada, denominada cromatina, que está envolta de um envelope nuclear e estabilizada por um complexo de proteínas denominadas protaminas. O acrossoma localiza-se na extremidade anterior da cabeça do espermatozoide sob o núcleo espermático, está envolto por uma dupla camada de membrana acrossomal (MA). Esta estrutura é repleta de enzimas hidrolíticas que

são liberadas após a fusão da MA com a membrana plasmática do espermatozóide durante a fecundação, com o intuito de permitir a passagem do espermatozoide pela zona pelúcia (Garner & Hafez, 2004).

A cauda ou flagelo espermático é a estrutura que confere motilidade ao espermatozoide e é composto de colo e peças principal, intermediária e terminal. O colo é a estrutura de conexão entre a cabeça e a peça intermediária da cauda. A parte interna do flagelo é constituída pelo axonema, responsável pela movimentação da cauda, composto por nove pares de microtúbulos dispostos radialmente ao redor dos dois filamentos centrais e recoberto por uma camada fibrosa que promove estabilidade aos elementos contráteis da cauda (Garner & Hafez, 2004). A peça intermediária, localizada imediatamente após o colo, contém um ordenamento de mitocôndrias em forma de hélice que geram energia para a movimentação espermática (Manella, 2000). O *annulus* faz a conexão entre a peça intermediária e principal, que se estende até a parte terminal da cauda e é caracterizada pela presença de uma bainha fibrosa que recobre o axonema e fornece suporte ao movimento flagelar. Por fim, a peça terminal, posterior à bainha fibrosa da peça principal, contém o axonema recoberto pela membrana plasmática (Garner & Hafez, 2004).

As membranas espermáticas – plasmáticas, acrossomal e nuclear - exercem papel fundamental na fisiologia do espermatozoide, portanto a integridade desta estrutura é essencial para o processo de fecundação (Celeghini et al., 2007). As membranas apresentam-se em estado líquido e são compostas por uma bicamada lipídica, proteínas, glicoproteínas e glicolipídios e em condições de estresse, como a criopreservação, essa estrutura pode sofrer rearranjos, formando pontos vulneráveis e, com isso, induzir a excessiva permeabilização ou o rompimento da membrana. As funções da membrana estão relacionadas ao metabolismo celular (manutenção do equilíbrio osmótico entre o meio extra e intracelular), capacitação espermática, reação acrossomal e interação do espermatozoide com o oócito (Peña et al., 2005).

2.2.1 Avaliação da cinética e função espermática

A qualidade do sêmen utilizado em uma biotécnica reprodutiva é fator relevante para o sucesso da aplicação da técnica, uma vez que o sêmen é bastante manipulado e, por isso, deve ser resistente aos diferentes procedimentos. Submeter a amostra seminal a alterações de temperatura e/ou contato com outras substâncias pode promover danos estruturais e funcionais ao espermatozóide reduzindo sua capacidade fecundante (Celeghini et al., 2007). Desta forma, é importante a utilização de testes que avaliem as diferentes funções espermáticas (CBRA, 1998), com o intuito de determinar o potencial de fertilidade de uma amostra seminal após condição de estresse, como a exposição direta às nanopartículas magnéticas.

Para ser capaz de fecundar um ovócito, o espermatozoide deve apresentar uma série de modificações seqüenciais que somente ocorrem quando as células espermáticas estão com suas funções e estruturas íntegras (Graham et al., 1990; Arruda, 2000). A observação laboratorial de uma única função espermática não permite mensurar adequadamente o potencial de fertilidade de uma amostra seminal, que depende da funcionalidade de diversos componentes da célula espermática (Braundmeier & Miller, 2001). Desta forma, é importante associar avaliações laboratoriais de diferentes funções do espermatozoide para determinar o grau de danificação do espermatozoide após condição de estresse e determinar a influência dos danos sobre a sua capacidade fecundante (Maziero et al., 2009).

a) Cinética espermática e teste de termo-resistência

A motilidade e velocidade espermática são importantes para a passagem do espermatozoide no trato genital da fêmea e penetração na zona pelúcida. Essas características do movimento espermático, portanto, devem ser avaliadas em uma amostra seminal, podendo ser um indicativo de infertilidade em machos (Olds-Clarke, 1996). A cinética espermática pode ser avaliada percentualmente através do teste de motilidade que avalia a qualidade e variação do movimento espermático em uma determinada quantidade de sêmen (Hafez & Hafez, 2004). No entanto, existem diversos padrões de movimento espermático em uma amostra de sêmen, tais como deslocamento retilíneo (movimento progressivo), em círculos, ou movimentos oscilatórios em um mesmo campo de observação (Salviano & Souza, 2008).

Dentre estes, o movimento progressivo é o de maior importância, pois permite o descolamento espermático até o gameta feminino (Kumar, 2000). Assim, o percentual de células com movimento retilíneo (motilidade progressiva) deve ser expresso separadamente do percentual de células móveis (motilidade) (CBRA, 1998).

Os testes de motilidade e motilidade progressiva (MOP) em uma amostra de sêmen podem ser realizados de forma subjetiva ou computadorizada (Graham & Mocé, 2005). A avaliação subjetiva é usualmente utilizada pelo baixo custo e fácil realização; é realizada sob microscopia óptica com uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula, estimando-se sua porcentagem visualmente, a critério do técnico, por isso pode apresentar altos índices de variação (Verstegen et al., 2002; Siqueira et al., 2007).

A utilização de sistemas de avaliação computadorizada das características espermáticas aumenta a objetividade e permite maior repetibilidade aos resultados. Para tanto, *softwares* de análise denominados *Computer assisted sêmen analysis* (CASA) são utilizados. Com esse sistema é possível visualizar e analisar a quantidade de células móveis, além da velocidade e característica do movimento espermático através de uma avaliação individual dos espermatozoides (Silva et al., 2009). Além do percentual de motilidade e motilidade progressiva, o sistema também analisa os seguintes parâmetros: linearidade (LIN) e retilinearidade (STR) expressos em percentual; velocidade curvilinear (VCL), velocidade em linha reta (VAP) e velocidade média do percurso (VSL) expressos em $\mu\text{m/s}$; além da frequência do batimento flagelar cruzado (BCF) expresso em Hertz (Hz) e amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) expresso em micrometros (μm) (Verstegen et al., 2002). Sendo que os parâmetros VCL, VAP e VSL quantificam o movimento da célula espermática, enquanto STR, LIN, ALH e BCF analisam a qualidade deste movimento (Silva et al., 2009). As análises de velocidade espermática são expressas pelo CASA através da análise do trajeto (Figura 4), sendo que a VCL refere-se ao percurso total que a célula espermática percorre em um determinado período de observação; a VSL é o percurso determinado em linha reta do primeiro ao último ponto de observação, enquanto a VAP é a estimativa do percurso médio que o espermatozoide desenvolveu durante o período de observação. As análises da característica do movimento da célula espermática estão relacionadas com a variação do movimento espermático. Sendo que LIN ($\text{VSL}/\text{VCL} \times 100$) e STR ($\text{VSL}/\text{VAP} \times 100$) são estabelecidas como uma proporção das velocidades, e BCF e ALH de acordo com as variações dos movimentos da cauda e da cabeça, respectivamente (Mortimer, 2000).

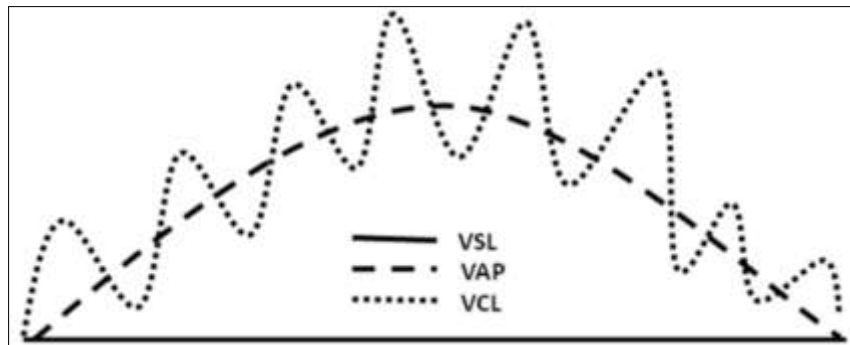


Figura 4 Representação esquemática das análises de velocidade expressas pelo sistema CASA em uma trajetória irregular (Mortimer, 2000)

Existem diversos equipamentos para a avaliação computadorizada do sêmen que podem apresentar variações na identificação do espermatozoide pela microscopia óptica do sistema e no *software* para reconstrução do movimento espermático. Basicamente, o sistema funciona através da seleção de diferentes campos de leitura contendo espermatozoides que formam as imagens congeladas e selecionadas para avaliação. O processador decodifica o movimento gerando as informações da trajetória do espermatozoide e quantifica as características do movimento espermático. Para isso é necessário programar o sistema para que somente espermatozoides sejam contabilizados no campo de leitura e para a avaliação de acordo com a espécie envolvida na amostra seminal, pois a característica do movimento espermático pode diferir entre espécie. No entanto, é importante considerar que existe variação em ejaculados de indivíduos da mesma espécie e em amostras seminais de um mesmo indivíduo, pois o sêmen é composto de células espermáticas com diferentes níveis de amadurecimento (Rodriguez & Martinez, 2007). Desta forma, a calibração do sistema para avaliação do movimento espermático é importante para evitar variabilidade dos resultados (Verstegen et al., 2002). Ainda assim alguns fatores podem influenciar na avaliação do movimento espermático, tais como, a presença de estruturas não espermáticas contabilizadas como espermatozoides, a leitura de aglomerado espermático como uma única célula e união da trajetória de dois espermatozoides após colisão, o que pode alterar os resultados emitidos pelo sistema (Mortimer, 1997; Arruda, 2000).

A correlação entre o movimento espermático e a fertilidade da amostra seminal já foi descrita tanto para avaliações subjetivas (Januskauskas et al., 2000) quanto para avaliações computadorizadas (Farrell et al., 1998; Gillan et al., 2008). Em associação ao teste de motilidade pode-se realizar o teste de termo-resistência (TTR), como um incremento da avaliação da cinética espermática. Baseia-se em avaliações periódicas de motilidade ao longo do tempo, avaliando-se a capacidade de manutenção da movimentação espermática durante incubação por pelo menos duas horas em temperatura de 37° C (Dimitropoulos, 1967), após o TTR espera-se a manutenção de pelo menos 15% da motilidade (CBRA, 1998). No entanto, em amostras descongeladas, pode-se ter uma superestimação da fertilidade avaliando-se somente a motilidade, devido aos danos gerados à membrana espermática durante o processo de congelamento, podendo afetar a funcionalidade do espermatozóide (Maxwell & Watson, 1996; Oehninger et al., 2000).

b) Avaliação da integridade da membrana plasmática e do acrossoma

A integridade da membrana plasmática (MP) está relacionada com a sobrevivência do espermatozóide e com a manutenção da sua capacidade de fertilização. A MP é muito sensível a modificações do ambiente a que o sêmen é exposto podendo apresentar danos estruturais que podem ser avaliados e quantificados através do uso de corantes supravitais (Hancock, 1952; Wilson et al., 1969), por testes de osmolaridade (Jeyendran et al., 1984) ou pelo uso de sondas fluorescentes (Rodriguez & Martinez et al., 1997; Arruda et al., 2002; Celeghini et al., 2007, 2010). Os testes permitem a análise da manutenção ou perda da função da membrana após condição de estresse. A utilização de sondas fluorescentes tornou-se recentemente uma importante ferramenta para avaliar a funcionalidade da célula espermática (Rodriguez & Martinez et al., 1997). O iodeto de propídio (IP) é largamente utilizado para avaliar a integridade da membrana plasmática do espermatozoide, pois somente penetra nas células com membrana lesada emitindo fluorescência vermelha após ligação específica com o DNA (Garner et al., 1986, 1994; Graham et al., 1990; Celeghini et al., 2007, 2010). A crescente utilização do IP deve-se à baixa toxicidade comparada ao seu antecessor brometo de etídio (Celeghini, 2005), a praticidade na preparação e aplicação da técnica,

estabilidade e eficiência em avaliar a membrana plasmática (Graham et al., 1990; Arruda et al., 2007). A correlação entre a fertilidade e a quantidade de espermatozoides viáveis expressos pelo teste de integridade da membrana plasmática é variável (Rodriguez-Martinez, 2003) podendo existir uma relação positiva entre o número de células viáveis e a taxa de fertilidade (Tanghe et al, 2002; Januskauskas et al., 2003; Tartaglione & Ritta, 2004) ou não existir uma relação direta entre esses dois parâmetros (Brito et al, 2003). Essa variabilidade dos resultados ratifica a importância da utilização de diferentes testes de avaliação das funções espermática em uma mesma amostra seminal, com o intuito final de prever a fertilidade e resistência do sêmen aos procedimentos das biotécnicas.

Outra função essencial do espermatozoide é a capacidade de reagir o acrossoma, essencial para a fecundação. A RA ocorre para que o espermatozoide seja capaz de penetrar o ovócito durante o processo de fecundação (Hafez & Hafez, 2004). A manutenção da integridade da estrutura acrossomal até o momento da ligação com a zona pelúcida é importante para que ocorra a fecundação, portanto a ocorrência prematura de reação acrossomal pode reduzir a fertilidade do sêmen (Silva & Gadella, 2006). A manipulação seminal pode promover modificações mecânicas na membrana plasmática, induzindo a capacitação espermática e, conseqüentemente, a reação acrossomal prematura (Cormier et al., 1997). Portanto, os testes laboratoriais que analisam a integridade da estrutura acrossoma são importantes para determinar a qualidade e a resistência de uma amostra seminal após condição de estresse. A integridade acrossomal pode ser avaliada por diferentes técnicas de fluorescência como marcadores enzimáticos de acrossina (Palencia et al, 1996) e sondas acidofílicas (Thomas et al., 1997). No entanto, o uso de sondas fluorescentes associadas a aglutinas tem sido uma técnica bastante empregada na avaliação desta estrutura (Maziero et al., 2009). As aglutininas são impermeáveis ao acrossoma intacto, mas quando ocorre a RA ou a danificação da estrutura estas macromoléculas se ligam a glicoproteínas presentes no acrossoma. Essa ligação pode ser analisada em microscopia de fluorescência através da associação das aglutininas com fluoresceínas, como o isoticianato de fluoresceína (Farlin et al., 1992; Nagy et al., 2003; Baker et al., 2004). As aglutininas comumente utilizadas para avaliar a condição do acrossoma são as aglutininas de *Psium sativum* (PSA), aglutininas de *Arachis hypogaea* (PNA), aglutininas de *Ricinus Communis* (RCA), ou ainda aglutininas de *Triticum vulgare* (WGA) ou *Conconavalina ensiformis* (ConA) (Cross & Meizel, 1989; Holden et al., 1990; Baker et al., 2004; Silva & Gadella, 2006). A escolha da aglutinina pode variar conforme a espécie avaliada, em bovinos utiliza-se sondas com PNA

ou PSA associadas à isotocianato de fluoresceína (FITC) (Nagy et al, 2003; Celeghini et al., 2007). A diferença entre as duas aglutininas é o sítio de ligação, o PNA tem especificidade por glicoproteínas da membrana acrossomal externa e o PSA por carboidratos presentes em componentes enzimáticos do conteúdo acrossomal. Em ambos os casos, a ligação da aglutinina ao conteúdo acrossomal e a emissão de fluorescência verde indica reação acrossomal na célula espermática (Silva & Gadella, 2006). Assim como na avaliação da integridade da membrana plasmática, existe uma variação de resultados relacionando os testes de integridade da cromatina à fertilidade seminal (Chan et al, 1996; Gillan et al, 2008).

A associação de sondas que tenham afinidades por diferentes estruturas espermáticas permite a avaliação simultânea das diversas funções do espermatozoide e é uma técnica bastante empregada para a avaliação mais acurada do sêmen (Garner et al, 1986, 1994; Graham et al., 1990; Arruda et al., 2002; Celeghini et al., 2007). Com a associação de iodeto de propídio, fluoresceína e aglutininas pode-se avaliar ao mesmo tempo a integridade da membrana plasmática do espermatozoide e a integridade do acrossoma (Thomas et al, 1997; Nagy et al., 2003), otimizando o tempo de avaliação da amostra e melhorando o prognóstico da fertilidade da amostra pela avaliação de mais de um parâmetro espermático (Tartaglione & Ritta, 2004).

2.2.2 Avaliação ultraestrutural da célula espermática

A avaliação da ultraestrutura permite a análise da célula espermática em uma proporção subcelular que não é observada em microscopia óptica. Essa avaliação é importante para observar possíveis alterações estruturais dos componentes do espermatozoide que possam ocorrer na escala nanométrica. Nesta escala, as alterações somente podem ser observadas em equipamentos mais precisos, como o microscópio eletrônico de transmissão. A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma ferramenta utilizada para determinar o tamanho e a forma das estruturas inorgânicas e biológicas baseada na interação dos elétrons incidentes sobre a matéria (Silva, 2010). A utilização da MET como técnica de avaliação espermática é substancialmente menor que as demais avaliações espermáticas, devido principalmente ao custo operacional da técnica. No entanto é uma técnica de grande

importância devido à possibilidade de avaliação das estruturas da célula espermática em uma escala muito pequena, favorecendo a visualização de alterações não observadas por meio dos testes comuns. Testes de avaliação da ultraestrutura dos espermatozoides já foram realizados em diferentes espécies de animais tais como cães (Silva et al., 2009), bovinos (Luque & Bao, 2006), caprinos (Hashida et al., 2005), ovinos (Pivko et al., 2009; Silva et al., 2011), galos (Soares & Belletti, 2006) e jumentos (Crespilho et al., 2006). Os testes possibilitaram a avaliação de modificações ultraestruturais após a manipulação do sêmen, principalmente no processo de congelação e descongelação, que não eram observados em testes utilizando microscopia óptica (Hashida et al., 2005; Silva et al., 2009; Silva, et al., 2011).

Portanto, a utilização de avaliações laboratoriais que permitam analisar as funções espermáticas associada à avaliação ultraestrutural do espermatozoide permite uma análise da célula espermática após o contato com diferentes substâncias ou após alterações de temperaturas. Desta forma, é importante utilizar-se destas ferramentas para uma investigação criteriosa do comportamento do espermatozoide após o contato direto com nanopartículas magnéticas.

3. OBJETIVOS

Objetivo geral

O presente trabalho tem por finalidade avaliar os efeitos no sêmen bovino de três diferentes concentrações do fluido magnético composto por nanopartículas magnéticas à base de maghemita recobertas por DMSA (ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico).

Objetivos específicos

Verificar a capacidade de resistência do sêmen bovino descongelado ao longo do tempo após exposição ao fluido magnético.

Avaliar os efeitos da exposição direta do fluido magnético no sêmen ao longo do tempo sobre a integridade da membrana plasmática e reação acrossomal.

Avaliar a capacidade de incorporação da nanopartícula magnética ao sêmen e os efeitos da exposição do fluido magnético na ultraestrutura do espermatozoide após incubação.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANZAR, M.; HE, L.; BUHR, M. M.; KROETSCH, T. G.; PAULS, K. P Sperm apoptosis in fresh and cryopreserved bull semen detected by flow cytometry and its relationship with fertility **Biology of reproduction** v.66, p. 354-360, 2002;

ARRUDA, R.P Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfomeria (ASMA). **Tese de livre Docência**. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 121p, 2000;

ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; PERES, K.R.; RAPHAEL, C.F.; CELEGHINI, E.C.C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. v.31(1), p.8-16, 2007;

ARRUDA, R.P.; SOUZA, N.L.; MARQUES, A.; CELEGHINI, E.C.C. GOBESSO, A.A.O.; MEIRELLES, F.V.; BINELLI, M.; BLASQUES, F.J.H. Evaluation of techniques using CFDA/PI, H258/FITC-PSA and TRYPAN BLUE/GIEMSA for assessment of the viability and acrossomal integrity of cryopreserved equine spermatozoa. **Theriogenology**v.57, n.1, p.477, 2002;

ASHBY, M.F.; FERREIRA, P. J.; SCHODEK, D. L. **Nanomaterials, nanotechnologies and design: an introduction for engineers and architects**. Reino Unido, Elsevier 2007. 540 p.2009 (Disponível em: <http://books.google.com.br> Acesso em 10/01/2011);

AUFFAN, M.; DECOME, L.; ROSE, J.; ORSIERE, T.; MEO, M.; BRIOIS, V.; CHANEAC, C.; OLIVI, L.; BERGE-LEFRANC, J. L.; BOTTA, A.; WIESNER, M. R., BOTTERO, J. Y. DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cytogenotoxic study **Environment, Science and Technology** v. 40 p. 4367-4373, 2006;

BAKER, S.S.; THOMAS, M.; THALER, C.D. Sperm membrane dynamics assessed by changes in lectin fluorescence before and after capacitation. **Journal of Andrology**, v. 25, p. 744-751, 2004;

BERRY, C., CURTIS A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics** v.36 p.198-206, 2003;

BRAUNDMEIER, A.G.; MILLER, D.J. The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. **Journal of Dairy Science**, v.84, p.1915-1925, 2001;

BRAZ, S.V. Avaliação morfológica do baço, linfonodo e fígado de macacos-prego (*CebusApella*) tratados com nanopartículas magnéticas recobertas com DMSA Dissertação de mestrado Universidade de Brasília, 2008 (Disponível em: http://bdtd.bce.unb.br/tesdesimplificado/tde_arquivos/43/TDE-2008-06-04T153038Z-2653/Publico/2008_ShelidaVasconcelosBraz_1.pdf Acesso em 23/11/2010);

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S., PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, p.1539-1551, 2003;

BROOKING, J.; DAVIS, S. S.; ILLUM, L. Transport of nanoparticles across the rat nasal mucosa. **Journal of Drug Targeting** v. 9, 267–279, 2001;

CADIOLI, L.P. & SALLA, D.S. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definições e principais aplicações desta inovadora tecnologia. **Revista de Ciências Exatas e Tecnologia** v. 1, n.º. 1 2006;

CASTRO, V. F.; CELESTINO, J.; QUEIROZ, A. A. A.; GARCIA, F. G. Propriedades magnéticas e biocompatíveis de nanocompósitos para utilização em magneto-hipertermia *Revista Brasileira de Física Médica* v. 4, p.79-82, 2010;

CATTIEN, S. Sprachenpreis Nanotechnology Course of study: industrial engineering and management. University of Applied Sciences TECHNISCHE FACHHOCHSCHULE BERLIN 2007 (Disponível em: http://projekt.beuth-hochschule.de/fileadmin/projekt/sprachen/sprachenpreis/erfolgreiche_beitraege_2007/3._Preis_07_-_Nanotechnology_-_Sarkis_Cattien.pdf Acesso em 11/01/2011);

CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal**. 2ª Ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 49p. 1998;

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. Pirassununga: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 186p. Tese de doutorado, 2005;

CELEGHINI, E.C.C.; ANDRADE, A.F.C.; RAPHAEL, C.F.; NASCIMENTO, J.; TICIANELLI, J.S.; ARRUDA, R.P. Damage assessment of the equine sperm membranes by fluorimetric technique. **Brazilian archives of biology and technology** v.53, n.6, p.1285-1292, 2010;

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO J.; RAPHAEL C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animal**, v. 42, p. 479-488, 2007;

CHAN, P.J.; CORSELLI, J.U.; JACONSON, J.D.; PATTON, W.C.; KING, A. Correlation between intact sperm acrosome assessed using the spermatic stain and sperm fertilizing capacity. **Journal of Andrology**, v. 36, p. 25-27, 1996;

CHEN, Y.; XUE, Z.; ZHENG, D.; XIA, K.; ZHAO, Y.; LIU, T; LONG, Z.; XIA, J. Sodium chloride modified silica nanoparticles as non-viral vector with a high efficiency of DNA transfer into cell **Current gene therapy** v. 3, p. 273-279, 2003;

CHO, K.; WANG, X.; NIE, S.; CHEN, Z. G.; SHIN, D. M. Therapeutic nanoparticles for drug delivery in cancer **Clinical Cancer Research** v. 14, p.1310-1317, 2008;

CHOULY, C.; POULIQUEN, D.; LUCET, I.; JEUNE, P.; PELLET, J.J. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particles size, charge and surface nature on biodistribution. **Journal of Microencapsulation** v.13, p. 245–255, 1996;

CORMIER, N.; SIRARD, M.A.; BAILEY, J.L. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. **Journal of Andrology**, v. 18, p. 461-468, 1997;

CREANGA, D. E.; CULEA, M.; NADEJDE, C.; OANCEA, S.; CURECHERIU, L.; RACUCIU, M. Magnetic nanoparticle effects on the red blood cells **Journal of Physics: Conference Series** v. 170, p.12-19, 2009;

CRESPILHO, A.M.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; PAPA, F.O. Infertilidade associada a defeito microtubular dos espermatozoides de jumento (*Equus asinus*) avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, .5, p. 1507-1510, 2006;

CROSS N.L.; MEIZEL, S. Methods for evaluating the acrossomal status of mammalian sperm. **Biology of Reproduction**, v. 41, p. 635-641, 1989;

DIMITROPOULOS, R. La signification du test de la thermo résistance dans l' appreciation de la valeur fécondante du sperm e congelé. **Annales de MédecineVétérinaire.**, v.4, p.215-224, 1967.

DIRICAN, E.K.; ÖZGÜN, O.D.; AKARSU S.; AKIN, K. O.; ERCAN, O.; UGURLU, M.; ÇAMSARI, Ç.; KANYILMAZ, O.; KAYA, A.; ÜNSAL, A. Clinical outcome of magnetic activated cell sorting of non-apoptotic spermatozoa before density gradient centrifugation for assisted reproduction **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** v.25, p. 375-381, 2008;

DURÁN, N.; MARCATO, P. D.; TEIXEIRA, Z. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: conceitos básicos (Disponível em: http://www.cienciaviva.org.br/arquivo/cdebate/012nano/Nanotecnologia_e_Nanobiotecnologia.pdf Acesso em 30/11/2010);

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J.; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of *Psium sativum agglutinin* in indentifying acrossomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**.v. 32, p. 23-27, 1992;

FARRELL, P.B.; PRESICCE, G.A.; BROCKETT, C.C.; FOOTE, R.H. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and the relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 49, p. 871-879, 1998;

FRANCIS G., BLANKENBERG P., KATSIKIS D., STORRS R. W., BEAULIEU C., SPIELMAN D., CHEN J. Y., NAUMOVSKI L., TAIT J.F. Quantitative analysis of apoptotic cell death using proton nuclear magnetic resonance spectroscopy **Blood** v. 89(10), p. 3778–86, 1997;

GAO, J. H.; ZHANG, W.; HUANG, P. B.; ZHANG, B.; ZHANG, X. X.; XU, B. Intracellular spatial control of fluorescent magnetic nanoparticles. **Journal of American Chemical Society** v.130, p. 3710–3711, 2008;

GAO, J., GU, H., XU, B. Multifunctional Magnetic Nanoparticles: Design, synthesis, and biomedical applications **Accounts of chemical research** v.42, n° 8, p. 1097-1107, 2009;

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAZEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Manole: São Paulo. p. 97-110, 2004;

GARNER, D.L.; JOHNSON, L.A.; YUE, S.T.; ROTH, B.L., HAUGLAND, R.P. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. **Journal of Andrology** v. 16(6), p. 620-629, 1994;

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoa function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses. **Biology of Reproduction**, v. 34, p. 127-138, 1986;

GILLAN, L., KROETSCH, T., CHIS MAXWELL, W.M., EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201-214, 2008;

GRAHAM, J.K., MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen **Theriogenology** v.64, p. 492-504, 2005;

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability acrossosomal integrity and mitochondrial function using flow cytometry **Biology of Reproduction**, v. 43, p.55-64, 1990;

GU, H. W.; HO, P. L.; TSANG, K. W. T.; WANG, L.; XU, B. Using biofunctional magnetic nanoparticles to capture vancomycin-resistant enterococci and other gram positive bacteria at ultralow concentration **Journal of American Chemical Society** v. 125, p. 15702-15703, 2003;

GUPTA, A.K.; GUPTA, M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles **Biomaterials** v. 26, p. 3995-4021, 2005a;

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Fertilização e Clivagem. In: HAZEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Manole: São Paulo. p. 111-125, 2004;

HANCOCK, J.L.A. The morphology of bull spermatozoa. **The Journal of Experimental Biology** v. 29, p.445-453, 1952;

HASHIDA, N.H.; ABDULLAH, R.B.; RAJIKIN, M.H.; MAT NOOR, M. Ultrastructural studies of fresh, frozen-thawed and acrosome-reacted goat sperm. **Biomedical Research** v. 16, n.2, p.119-123, 2005;

HOLDEN, C.A.; ROSS, V.H; SATHANANTHAN, A.H.; TROUNSON, A.O. Assessment of the human sperm acrossome reaction reaction using concavalin A lectin. **Molecular Reproduction and Develoment**, v. 25, p. 247-257, 1990;

HOSOKAWA, M.; NOGI, K.; NAITO, M.; YOKOYAMA, T. **Nanoparticle technology handbook**. Primeira edição. Reino Unido: Elsevier. 644 p. 2007 (Disponível em: <http://books.google.com.br> Acesso em 10/01/2011);

ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. **Journal of bioscience and bioengineering** v. 100 (1), p. 1-11, 2005;

- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatin structure, and field fertility. **Theriogenology**, v. 60, p. 743-758, 2003;
- JANUSKAUSKAS, A.; JOHANNISSON, A.; SÖDERQUIST, L.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assessment of sperm characteristics post-thaw and respond to calcium ionophore in relation to fertility in Swedish dairy AI bulls. **Theriogelony**, v. 53, p. 859-975, 2000;
- JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.; ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984;
- KIM, T. S.; LEE, S. H.; GANG, G. T.; LEE, Y. S.; KIM, S. U.; KOO, D. B.; SHIN, M. Y.; PARK, C. K.; LEE, D. S. Exogenous DNA uptake of boar spermatozoa by a magnetic nanoparticle vector system **Reproduction in Domestic Animal** v.45, p. 201-206, 2010;
- KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of in vitro fertilizing capacity of spermatozoa. **Indian Veterinary Medicine Journal** v. 24, p. 1-6, 2000;
- LACAVAL, B.M. **Síntese de fluido magnético a base de maghemita para produção da nanocapsulas magnéticas de albumina bovina**. Dissertação para o programa de Pós Graduação do Instituto de Química, Universidade de Brasília, Distrito Federal, 2009;
- LIMBACH, L. K.; LI, Y.; GRASS, R. N.; BRUNNER, T. J.; HINTERMANN, M. A.; MULLER, M.; GUNTHER, D.; STARK, W. J. Oxide Nanoparticle Uptake in Human Lung Fibroblasts: Effects of Particle Size, Agglomeration, and Diffusion at Low Concentrations **Environment Science and Technology**, v. 39, p.9370-9376, 2005
- LUQUE, M.C.A.; BÃO, S.N. Structural and ultrastructural characterization of Zebu (*Bosindicus*) spermatozoa. **Biocell** v. 30, n.1, p.33-38, 2006;
- McBAIN, S.C.; YIU, H.H.P.; DOBSON, J. Magnetic nanoparticles for gene and drug delivery. **International Journal of Nanomedicine** v. 3(2), p. 169-180, 2008;
- MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; MILANI, A. S.; STROEVE, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticle **Journal of colloid and interface science** v. 336 (2), p. 510-518, 2009;
- MAKHLUF, S.B.D.; QASEM, R.; RUBINSTEIN, S.; GEDANKEN,A.; BREITBART, H. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. **Langmuir**, v.22, p.9480-9482, 2006.
- MANELLA C.A. Introduction: our changing views of mitochondria. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 32, p. 1-4, 2000;
- MAXWELL, W.M.C.; WATSON, P.F. Recent progress in the preservation of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 55-56, 1996;

MAZIERO, R.R.D.; CRESPILO, A.M.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; DELL'AQUA JUNIOR, J.A.; PAPA, F. O. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade **Revista Brasileira de Reprodução Animal** Suplemento, n.6, p.5-10, 2009;

MOERSDORF, D.; HUGOUNENQ, P.; PHUOC, L. T.; MAMLOUK-CHAOUACHI, H.; FELDER-FLESH, D.; BEGIN-COLIN, S.; POURROY, G.; BERNHARDT, I. Influence of magnetic iron oxide nanoparticles on red blood cells and Caco-2 cells **Advances in Bioscience and Biotechnology** v.1, p. 439-443, 2010;

MORALES, M.M. Terapias avançadas: células-tronco, terapia gênica e nanotecnologia aplicada à saúde. São Paulo. Editora Atheneu. 336p. 2007.

MORAIS, P.C. Sistemas magnéticos nanoparticulados: produção, caracterização e aplicações. VII Escola Brasileira de Magnetismo, 2009 (Disponível em: http://www.sbf1.sbfisica.org.br/eventos/ebm/vii/T_completo/mini-curso_Morais.pdf Acesso em 10/01/2011);

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals **Human Reproduction Update** v. 3, n. 5, p. 403-139, 1997;

MORTIMER, S.T. CASA – Practical aspects. **Journal of Andrology** v. 21, n. 4, p. 515-524, 2000;

MURPHY, C.J.; GOLE, A.M.; STONE, J.W.; SISCO, P.N.; ALKILANY, A.M.; GOLDSMITH, E.C.; BAXTER, S.C. Gold nanoparticles in biology: beyond toxicity to cellular imaging. **Accounts of chemical research** DOI: 10.1021/ar800035u, 2008;

NAGY, S.; JANSEN, J.; TOPPER, E.K.; GADELLA, B.M. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-Membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. **Biology of Reproduction**. v. 68, p. 1828-1835, 2003;

NEUBERGER, T.; SCHOPF, B.; HOFMANN, H.; HOFMANN, M.; VON RECHENBERG, B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 293, p.483–496, 2005;

NUNN, A. V. W.; BARNARD, M. L.; BHAKOO, K.; MURRAY, J.; CHILVERS, E.J.; BELL, J. D. Characterisation of secondary metabolites associated with neutrophil apoptosis **FEBS Letters** v. 392 p. 295–298, 1996;

OEHNINGER, S.; DURU, N.K.; SRISOMBUT, C.; MORSHEDI, M. Assessment of sperm cryodamage and strategies to improve outcome. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 169, p. 3-10, 2000;

OLDS-CLARKE, P. How does poor motility alter sperm fertilizing ability? **Journal of Andrology** vol. 17, n.3, p. 183-186, 1996;

PALENCIA, D.D.; GARNER, D.L.; HUDIG, D.; HOLCOMBE, D.N.; BURNER, C.A.; REDELMAN, D.; FERNADEZ, G.C.J.; ABUELYAMAN, A.S.; KAM, C.M.; POWERS, J.C.

Determination of activable proacrosin/acrosin in bovine sperm using an irreversible isocoumarin serine protease inhibitor. **Biology of Reproduction**.v. 55, p.536-542, 1996;

PEÑA, F.J.; SARAVIA, F.; JOHANNISSON, A.; WALGREN, M.; RODRIGUEZ MARTINEZ, H. A new and simple method to evaluate early membrane changes in frozen-thawed boar spermatozoa. **International Journal of Andrology**. v.28, p.107-114, 2005;

PETERSON, C.L. Nanotechnology: from Feynman to the Grand Challenge of Molecular Manufacturing **IEEE Technology and society magazine** 2004;

PISANIC, T. R.; BLACKWELL, J. D.; SHUBAYEV, V. I.; FIÑONES, R. R.; JIN, S. Nanotoxicity of iron nanoparticle internalization in growing neurons **Biomaterial** v. 28 p. 2572-2581, 2007;

PIVKO, J.; MAKAREVICH, A.V.; KUBOVICOVA, E.; RIHA, L'; SIROTKIN, A.V.; MATEJASAKOVÁ, E. Ultrastructural alterations in sperm heads under influence of several implementers to ram semen. **Slovak Journal of Animal Science** v. 42 (4), p. 149-154, 2009;

RABIAS, I.; FARDIS, M.; DEVLIN, E.; BOUKOS, N.; TSITROULI, D.; PAPAVALASSIOU, G. No aging phenomena in ferro fluids: the influence of coating on interparticle interactions of maghemite nanoparticles **American Chemical Society** v.2, n°. 5, p. 977-983, 2008;

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: still utopia? **Reproduction in Domestic Animals**, v.38, p.312-318, 2003;

RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. State of the art in farm animal sperm evaluation. **Reproduction, Fertility and Development**v. 19, p. 91-101, 2007;

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; LARSSON B.; PERTROFT, H. Evaluation of sperm damage and techniques for sperm clean-up. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 9, p. 297-308, 1997;

SAHU, S.C., CASCIANO, D.A. Nanotoxicity: From In Vivo and In vitro models to health risks. 609 p., 2009.

SAID, T.M.; AGARWAL, A.; ZBOROWSKI, M., GRUNEWALD, S.; GLANDER, H.; PAASCH, U. Utility of Magnetic Cell Separation as a Molecular Sperm Preparation Technique **Journal of Andrology** v. 29, No. 2, p.134-142 DOI: 10.2164/jandrol.107.003632 2008.

SALATA, O.V. Application of nanoparticles in biology and medicine **Journal of nanobiotechnology** v. 2:3, DOI: 10.1186/1477-3155-2-3, 2004;

SALVIANO, M.B.; SOUZA, J.A.T. Avaliação andrológica e tecnologia do sêmen caprino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 32, n. 3, p. 159-167, 2008;

SESTIER, C.; LACAVAL, Z. G. M.; LACAVAL, L. M.; DA SILVA, M. F.; AZEVEDO, R. B.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P. C.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; SABOLOVIC, D. In vitro toxicity of magnetic fluids evaluated for macrophage cell lines **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 252, p. 403-405 2002;

SHEN, H. M.; DAI, J.; CHIA, S. E.; LIM, A.; ONG, C. N. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. **Human Reproduction** v.17, p.1266–1273, 2002;

SILVA, A.R.; FONTENELE-NETO, J.D.; CARDOSO, R.C.S.; SILVA, L.D.M.; CHIRINÉA, V.H.; LOPES, M.D. Description of ultrastructural damages in frozen-thawed canine spermatozoa. **Ciência Animal Brasileira** v. 10, n.2, p.595-601, 2009;

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, p. 958-978, 2006;

SILVA, S.V. Avaliação de espermatozoides ovinos criopreservados em tris-gema acrescido de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. **Tese de Doutorado** Universidade Federal Rural de Pernambuco, 2010;

SILVA, S.V.; BATISTA, A.M., COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão **Ciência Veterinária nos Trópicos** v.12, n. 1/2/3, p. 1-15, 2009;

SILVA, S.V.; SOARES, A.T.; BATISTA, A.M.; ALMEIDA, F.C.; NUNES, J.F.; PEIXOTO, C.A.; GUERRA, M.M.P *In vitro* and *in vivo* evaluation of ram sperm frozen in tris egg-yolk and supplemented with superoxide dismutase and reduced glutathione. **Reproduction in Domestic Animals** DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01758.x, 2011;

SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação do sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática *in vitro* **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 36, n.2, p.387-395, 2007;

SOARES, J.M.; BELETTI, M.E. Avaliação da morfologia e da compactação cromatínica em espermatozoides de galo (*Gallus gallu*, Linnaeus, 1758) através de microscopia eletrônica de transmissão. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science** v. 43, n.4, p. 554-560, 2006;

SOENEN, S. J. H. & DE CUYPER, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes **Contrast Media Molecular Imaging**, v. 4, p. 207–219, 2009;

SUNG, S.; ZENG, H.; ROBINSON, D. B.; RAOUX, S.; RICE, P. M.; WANG, S. X.; LI, G. Monodisperse Fe₂O₄ (M= Fe, Co, Mn) nanoparticles **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n°.1, p.273-279, 1994;

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; MAES, D.; DE KRUIF, A. Assessment of different sperm quality parameters to predict *in vitro* fertility of bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, p. 127-132, 2002;

TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of *in vitro* fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004;

TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; GONZÁLEZ-CARREÑO, T.; SERNA, C. J. The preparation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics** v.36, p. 182–197, 2003;

THOMAS, C.A.; GARNER, D.L.; DEJARNETTE, J.M.; MARSHALL, C.E. Fluorometric assessments of acrossomal integrity and viability in cryopreserved bovine spermatozoa. **Biology of Reproduction**. v. 56, p.991-998, 1997;

THOMPSON, C. B. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. **Science** v. 267, p. 1456–1462, 1995;

THÜNEMAN, A. F.; SHÜTT, D.; KAUFNER, L.; PISON, U.; MOHWALD, H. Maghemite nanoparticles protectively coated with poly(ethylene amine) and poly(ethylene oxide-block-poly (glutamic acid) **Langmuir**, v.22, p.2351-2357, 2006;

VALOIS, C. R. A.; BRAZ, J. M.; NUNES, E. S.; VINOLO, M. A. R.; LIMA, E. C. D.; CURI, R.; KUEBLER, W. M.; AZEVEDO, R. B. The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via $\beta 2$ integrin-dependent pathway **Biomaterial** v. 21, p. 366-374, 2010;

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; OCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149-179, 2002;

WADA, S.; TAZAWA, K.; FURUTA, I.; NAGAE, H. Antitumor effect of new local hyperthermia using dextran magnetite complex in hamster tongue carcinoma. **Oral Disease** v. 9, p.218-223, 2003;

WALTERS, A.H.; EYESTONE, W.E.; SAACKE, R.G.; PEARSON R.E.; GWAZDAUSKAS, F.C Sperm morphology and preparation method affect bovine embryonic development **Journal of Andrology**v. 25, n.4, p. 554-563, 2004;

WANG, J.; CHEN, Y.; CHEN, B., DING, J.; XIA,G.; GAO,C.; CHENG, J.; JIN, N.; ZHOU, Y.; LI, X.; TANG, M.; MEI WANG, X. Pharmacokinetic parameters and tissue distribution of magnetic Fe₃O₄ nanoparticles in mice. **International Journal of Nanomedicine**, v.5, p. 861–866, DOI: 10.2147/IJN.S13662, 2010

WANG, L.; YANG, Z. M.; GAO, J. H.; XU, K. M.; GU, H. W.; ZHANG, B.; ZHANG, X. X.; XU, B. A biocompatible method of decorporation: Bisphosphonate-modified magnetite nanoparticles to remove uranyl ions from blood **Journal of American Chemical Society** v. 128, p.13358–13359, 2006;

WHEELER, M.B.; CHOI, S.J.; VOELKER, G.R.; WALTERS, E.M.; CEZAR, G.G. Produção de animais transgênicos nas espécies domésticas: tecnologia e aplicações. In: GONÇALVES, P.B.D., FIGUEIREDO, J.R., FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p.303-340, 2001.

WILSON, H.R.; WARNICK, A.C.; GUTIERREZ, J.H. Differentiation of live from dead spermatozoa in cock semen. **Poultry Science**, v. 48, p. 714-717, 1969;

WIWANITKIT, V.; SEREEMASPUN, A.; ROJANATHANES, R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report **Fertility and Sterility** v.71, p. 7-8, 2007;

XU, C. J.; XU, K. M.; GU, H. W.; ZHENG, R. K.; LIU, H.; ZHANG, X. X.; GUO, Z. H.; XU, B. Dopamine as a robust anchor to immobilize functional molecules on the iron oxide shell of magnetic nanoparticles **Journal of American Chemical Society** v. 126, p. 9938–9939, 2004a;

XU, C. J.; XU, K. M.; GU, H. W.; ZHONG, X. F.; GUO, Z. H.; ZHENG, R. K.; ZHANG, X. X.; XU, B. Nitrilotriacetic acid-modified magnetic nanoparticles as a general agent to bind histidine-tagged proteins **Journal of American Chemical Society** v. 126, p. 3392–3393, 2004b;

YANG, H.; LIU, C.; YANG, D., ZHANG, H. XI, Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition **Journal of applied toxicology** v.29, p.69-78, 2009

ZANETTI-RAMOS, B.G. & CRECZYNSKI-PASA, T.B. O desenvolvimento da nanotecnologia: cenário mundial e nacional de investimentos **Revista Brasileira de Farmácia** v. 89 (2), p. 95-101, 2008;

ZANI, M.; LAVITRANO, M.; FRENCH, D.; LULLI, V.; MAIONE, B.; SPERANDIO, S.; SPADAFORA, C. The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. **Experimental Cell Research** v. 217, p 57–64, 1995;

ZHANG, B.R.; LARSON B.; LUNDEHEIM, N., RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm characteristics and zona pellucida binding in relation to field fertility of frozen-thawed semen from dairy AI bulls. **International Journal of Andrology**.v.21, p.207–216, 1998;

CAPÍTULO 2

VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS APÓS EXPOSIÇÃO ÀS NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS COM DMSA

1. RESUMO

VIABILIDADE DOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS APÓS EXPOSIÇÃO A NANOPARTÍCULAS DE MAGHEMITA RECOBERTAS COM DMSA

Denise Ferreira Caldeira¹, Carolina Madeira Lucci²

¹ Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, UnB/DF; ²PhD, Instituto de Biologia, UnB/DF

As nanopartículas magnéticas podem ser utilizadas nas diversas áreas biológicas, inclusive na reprodução assistida. A resposta espermática após contato com fluido magnético contendo nanopartículas de maghemita recoberta com DMSA foi avaliada com o intuito de determinar a toxicidade do nanomaterial. Sêmen bovino descongelado, após passagem pelo gradiente de *Percoll*, foi incubado a 37,5 °C em meio SP-TALP+ (BSA 1,5%) adicionado de fluido magnético (FM) com concentrações finais de 0,06, 0,03 e 0,015 mg de Fe/mL. O grupo controle, sem adição de FM, foi incubado apenas com meio SP-TALP+. Durante a incubação avaliou-se a cinética espermática através do sistema CASA a cada 15 minutos durante duas horas, bem como na terceira e quarta horas de incubação. No início da incubação (zero hora), na segunda e na quarta horas também foram avaliadas a integridade da membrana plasmática e a reação acrossomal por meio da associação de corantes fluorescentes (iodeto de propídio e FITC-PNA). Ao final do período de incubação, o sêmen remanescente de cada tratamento foi fixado para análise em microscópio eletrônico de transmissão (MET). Observou-se que para os parâmetros do CASA, integridade da membrana e reação acrossomal não houve influência da nanopartícula na resposta do sêmen ao longo do período de incubação, independente da concentração utilizada. Na análise da MET não foram observados danos ultraestruturais à células espermática após contato com o FM. Também não foi observado internalização das nanopartículas em nenhum grupo tratado com FM. Desta forma, o FM contendo nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA pode ser utilizado em contato direto com o sêmen para o incremento das técnicas de reprodução assistida, uma vez que não há alteração na função e estrutura espermática nas condições testadas.

Palavras-chave: Biotecnologia; Toxicidade; Espermatozoide; Nanotecnologia

2. ABSTRACT

VIABILITY OF BULL SPERMATOZOA AFTER EXPOSURE TO MAGHEMITE NANOPARTICLE COATED WITH DMSA

Denise Ferreira Caldeira¹, Carolina Madeira Lucci²

¹School of Agronomy and Veterinary Medicine, UnB/DF; ²PhD, Biology Institute, UnB/DF

The magnetic nanoparticles can be used in different areas of biology, including assisted reproduction. The sperm response after exposure to magnetic fluid containing maghemite nanoparticles coated with DMSA was evaluated in order to determine the toxicity of the nanomaterial. After passage through the *Percoll* gradient, frozen-thawed bull semen was incubated at 37.5 °C in SP-TALP+ medium (1.5% BSA) added to the magnetic fluid (MF) with final concentrations of 0.06, 0.03 and 0.015 mg Fe/mL. The control group, without MF, was just incubated with SP-TALP+ medium. During incubation the sperm kinetic pattern was assessed using CASA system, the assessments were performed every 15 minutes during two hours, as well as in the third and fourth hours of incubation. At the beginning of the incubation (hour zero), as well as in the second and fourth hours the integrity of the sperm plasma membrane and acrosome reaction were evaluated through the combination of fluorescent dyes (propidium iodide and FITC-PNA). In the ETM analysis, sperm cells ultrastructural damage were not observed after exposure to the FM. The uptake of nanoparticles by the spermatozoa was also not observed in any group treated with MF. Thus, the MF containing maghemite nanoparticles coated with DMSA can be used in semen in order to improve the assisted reproduction techniques, since there is no change in sperm function and structure under the conditions tested.

Key-Words: Biotechnology; Toxicity; Sperm; Nanotechnology

3. INTRODUÇÃO

As nanopartículas magnéticas (NPM) despertam grande interesse dos cientistas devido ao tamanho em escala nanométrica (bilionésima parte do metro) e à possibilidade de manipulação à distância, através do uso de um campo magnético externo (Sung et al. 1994; Berry & Curtis, 2003). Devido a essas características, promissoras possibilidades de aplicações biomédicas das NPM são alcançadas *in vivo* e *in vitro* (Gao et al., 2009), com destaque para a vetorização de fármacos (Neuberger et al., 2005; McBain et al., 2008), separação celular e de outros compostos (Gu et al., 2003, Wang et al., 2006), diagnóstico por imagem (Halavaara et al. 2002; Billotey et al., 2003) e tratamento de câncer por magnetohipertermia (Tartaj et al., 2003; Wada et al., 2003).

Apesar de originadas dos mais diversos óxidos metálicos, as NPM a base de óxido de ferro apresentam baixo potencial tóxico ao organismo quando comparadas a outros metais (Braz, 2008; Lin et al., 2010). As NPM férricas são denominadas nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) ou maghemita ($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), sendo a última de utilização mais frequente devido ao estado já oxidado (Mcbain et al., 2008). No entanto, as nanopartículas magnéticas para serem utilizadas nas ciências biológicas devem estar associadas a coberturas orgânicas ou moléculas, com o intuito de conferir-lhes maior estabilidade, reduzir seu potencial tóxico, e em alguns casos, promover especificidade por um sítio de ligação (Salatta, 2004). Entre as coberturas orgânicas, destaca-se o uso do DMSA (ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico) devido ao seu baixo potencial tóxico (Auffan et al., 2006). Além disso, a utilização de NPM é facilitada quando estas estão suspensas em solventes específicos, formando um fluido magnético que previne a aglomeração das nanopartículas, favorecendo sua aplicação em meios biológicos (Lacava, 2009).

Para que possam ser utilizadas em larga escala, testes de citotoxicidade com NPM são realizados com o intuito de conhecer o comportamento das estruturas biológicas na presença desses nanomateriais. Desta forma, observa-se que muitos fatores podem influenciar a resposta dos testes de citotoxicidade utilizando as NPM, tais como: características da partícula (tamanho primário, composição, carga elétrica, estado de aglomeração), tipo de cobertura utilizada, tempo de contato com o modelo biológico, entre outros (Yang et al., 2009; Auffan et al., 2009, Mahmoudi et al., 2009). Apesar de as inúmeras aplicações das nanopartículas magnéticas serem promissoras, esses nanomateriais devem ser estudados com

o intuito de elucidar o comportamento fisiológico de todas as estruturas envolvidas de acordo objetivo de sua aplicação.

Embora o foco principal de utilização das NPM ainda sejam as aplicações terapêuticas e diagnósticas, a expansão de sua utilização já pode ser observada em áreas como a reprodução, como na transfecção de espermatozoides para produção de animais transgênicos (Kim et al., 2010) e em técnicas de separação de espermatozoides apoptóticos (Dirican et al., 2008). No entanto, pouco se conhece a respeito do comportamento de células espermáticas na presença de nanopartículas magnéticas. Estudos com nanopartículas de maghemita recobertas com álcoolpolivinílico (PVA) demonstram que as nanopartículas são internalizadas pelo espermatozoide, sem, contudo, reduzir sua motilidade e sua capacidade de reação acrossomal (Makhluf et al., 2006). No entanto, nanopartículas a base de ouro reduziram a motilidade espermática após o contato direto do sêmen com as partículas (Wiwanitkit et al., 2007). Portanto, a resposta espermática à presença das nanopartículas ainda não é bem conhecida, sendo necessário o uso de testes específicos que avaliem diferentes estruturas e funções espermáticas na presença ou ausência de nanopartículas de forma a determinar se a capacidade fecundante do espermatozoide é comprometida na presença das NPM.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos decorrentes da exposição a concentrações crescentes de fluido magnético composto por nanopartículas de maghemita recobertas por DMSA na viabilidade dos espermatozoides bovinos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras de sêmen

As amostras de sêmen congelado (0,5mL) foram adquiridas de uma central de processamento de sêmen animal (ABS Pecplan, Uberaba, Minas Gerais, Brasil) e mantidas em botijão criogênico a -196°C até o descongelamento das palhetas para o experimento. Amostras de três touros foram utilizadas no presente estudo.

4.2 Obtenção do fluido magnético

O fluido magnético (FM) contendo as nanopartículas de maghemita revestidas de DMSA dispersas em meio aquoso com 0,9% NaCl e pH fisiológico (7,2-7,4) foi produzido e gentilmente cedido pela Prof. Dr^a Emília Lima, do Laboratório de Química da Universidade de Goiás. O FM continha aproximadamente $16,5 \times 10^{16}$ nanopartículas/mL com diâmetro médio de 5,3 nm e uma concentração de ferro de 17mg/ml.

Para a produção do FM soluções aquosas de cloreto férrico e cloreto ferroso foram misturadas em uma proporção molar de 2:1 com solução aquosa de amônia concentrada, em uma agitação vigorosa. Em seguida, foi adicionada uma solução de DMSA (0,3 mol/L) em uma razão molar DMSA/Fe de 11%. O NaCl foi adicionado à suspensão para alcançar uma concentração salina de 0,9% (p/v). O pH foi ajustado para 7,2-7,4 (Braz, 2011).

Para estabilizar as nanopartículas dispersas no fluido magnético a fim de evitar a aglomeração e manter o diâmetro hidrodinâmico próximo da solução inicial, corrigiu-se a albumina séria bovina (BSA) do meio SP-TALP (0,1 M de NaCl; 25 mM de NaHCO_3 ; 3,1 mM de KCl; 0,29mM de NaH_2PO_4 ; 10 mM de HEPES; 0,01mg/mL de Fenol Red; 0,028 M de Lactato de Sódio; 2,1 mM de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,39 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; 1 mM de piruvato de sódio; 0,075mg/mL de amicacina; 0,6% de BSA; 0,01% penicilina/estreptomicina) até uma concentração final de 1,5% (SP-TALP+), conforme estabelecido por Braz (2011). A cada

repetição do experimento diluía-se 7µL de FM em 933 µL de meio SP-TALP+ para obtenção de uma concentração final de ferro de 0,12 mg/mL (solução de trabalho).

4.3 Processamento do sêmen

Para cada repetição, três palhetas de sêmen, de um mesmo touro, eram retiradas do botijão e imediatamente submersas em água a uma temperatura de 37,5 °C para descongelamento. Cortava-se a extremidade da palheta e o sêmen era despejado em um Eppendorff® de 1,5mL, para cada palheta o mesmo procedimento era realizado.

Após o descongelamento, cada amostra de sêmen era adicionada cuidadosamente a um Eppendorff® contendo 800 µL de gradiente de *Percoll*, sendo 400µL de *Percoll* a 90% e 400 µL de *Percoll* a 45%. Os Eppendorff® eram então centrifugados a uma velocidade de 9000g por 5 minutos, conforme protocolo descrito por Machado et al. (2009).

Em seguida, os *pellets* das três amostras de sêmen eram retirados cuidadosamente do fundo dos Eppendorffs®, ressuspensos em 1mL de meio SP-TALP+ e novamente centrifugados por 5 minutos. O *pellet* produzido era ressuspensado em 420 µL de SP-TALP+. Desta suspensão de sêmen e SP-TALP+, eram retirados 10 µL para avaliação da concentração em câmara de Neubauer.

4.4 Tratamentos

O experimento foi dividido em quatro tratamentos: grupo controle (sem adição de nanopartículas - CO); grupo de maior concentração de NMP (0,06 mg de Fe/ml – G0,06); grupo de concentração média de NMP (0,03 mg de Fe/ml –G0,03) e grupo de menor concentração de NMP (0,015 mg de Fe/ml – G0,015). Para formação dos grupos, 100 µL da mistura de sêmen e SP-TALP+ eram misturados em solução de trabalho de fluido magnético (nos grupos tratados) ou em SP-TALP+ em um Eppendorff®, conforme a concentração final de ferro desejada (Tabela 2.1). O volume final de solução em cada tratamento era de 200 µL.

Tabela 1 Quantidade da suspensão de sêmen, solução de trabalho do fluido magnético e meio SP-TALP+ adicionados para formação da solução final de 200 μL utilizada em cada tratamento. Na última coluna tem-se a concentração de ferro obtida em cada tratamento.

TRATAMENTO	QUANTIDADE DA MISTURA SEMEN+SP-TALP+ (μL)	QUANTIDADE DE SOLUÇÃO DE TRABALHO DE FM (μL)*	QUANTIDADE DE SP TALP+ (μL)	CONCENTRAÇÃO FINAL DE Fe (mg/mL)
CONTROLE	100	-	100	0
G0,015	100	25	75	0,015
G0,03	100	50	50	0,03
G0,06	100	75	25	0,06

*A solução de trabalho do fluido magnético foi produzido através da diluição de 7 μL de FM em 933 μL de meio SP-TALP+.

4.5 Avaliação da cinética e resistência espermática

Para avaliação da cinética e da resistência espermática, as amostras dos grupos foram mantidas em banho-maria a 37°C para avaliação periódica da cinética espermática ao longo de quatro horas. As análises do movimento espermático foram determinadas através do *software* CASA (Ivos-Ultimate12HamiltonThorne, Beverly, Massachusetts, Estados Unidos da América). As avaliações foram feitas na hora zero (assim que os grupos eram formados) e a cada 15 minutos durante duas horas, além da terceira e quarta horas de incubação. Ao todo, foram realizadas nove repetições para cada tempo avaliado.

Para cada avaliação no CASA, as amostras de sêmen foram homogeneizadas para retirar 1 μL de sêmen que era depositado em lâmina de leitura específica (Leja® standard count, SC 20.01.08.B, 20 microns, Nieuw-Vennep, Holanda). As amostras foram avaliadas no sistema previamente ajustado para análise de sêmen bovino. Todos os grupos foram avaliados em cada tempo.

Os parâmetros de movimentação espermática avaliados pelo programa foram: motilidade total (%), motilidade progressiva (%), velocidade de trajeto ($\mu\text{m/s}$), velocidade

retilínea ($\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea ($\mu\text{m/s}$), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (μm), frequência de batimento flagelar (Hz); linearidade (%) e retilinearidade (%).

4.6 Avaliação da integridade da membrana plasmática e integridade acrossomal

Para avaliação da integridade da membrana plasmática e acrossomal foi utilizada uma conjugação de isoticianato de fluoresceína e lecitina de amendoim (FITC-PNA) associado a Iodeto de propídio. Para constituição da solução de trabalho de corante foi utilizado 20 μL da solução estoque de FITC-PNA (1mg de FITC-PNA, 1mL de PBS), 10 μL da solução estoque de iodeto de propídio (10mg de iodeto de propídio, 10mL de solução fisiológica), 10 μL da solução estoque de formaldeído (diluição 1:8 de formalina 40% em solução fisiológica) e 960 μL de solução estoque de citrato de sódio (3g de citrato de sódio, 100mL de solução fisiológica). A solução estoque dos corantes foi mantida congelada em alíquotas suficientes para utilização em um dia de experimento; a solução estoque de citrato de sódio e de formaldeído foram mantidas refrigeradas a 4°C. Nos dias de realização do experimento, as alíquotas dos corantes foram descongeladas em temperatura ambiente para serem adicionadas às soluções de citrato de sódio e formaldeído. A solução de trabalho do corante foi mantida em Eppendorff® protegido da luz por papel laminado. Os Eppendorff® utilizados nas amostras de corante com espermatozoides também foram encobertos com papel laminado para evitar que a ação da luz prejudicasse a capacidade do corante.

As avaliações foram feitas no momento da formação dos grupos (zero hora), na segunda e quarta horas de incubação. Cada amostra era composta por 10 μL de sêmen diluído em 30 μL da solução de trabalho do corante. Uma alíquota de sêmen de cada grupo era retirada do Eppendorff® para adição do corante em Eppendorff® separado. As amostras foram lidas em microscópio de contraste de fase e epifluorescência utilizando filtro de comprimento de onda 494/517 excitação/emissão (AxiophotZeiss, *College Station*, Texas, Estados Unidos), no máximo cinco horas após a adição do corante ao sêmen. Para a leitura, 10 μL da solução de sêmen com corante foi retirado e colocado sobre uma lâmina e recoberta com lamínula. Foram contados entre 100 e 200 espermatozoides por avaliação.

Quanto à integridade da membrana plasmática e integridade do acrossoma os espermatozoides foram classificados da seguinte forma (Klinc & Rath, 2007):

- a) Membrana lesionada e acrossoma íntegro: presença de coloração vermelha na cabeça (corado pelo iodeto de propídio) e ausência de coloração no acrossoma;
- b) Membrana lesionada com acrossoma reagido ou falsa reação do acrossoma: presença de coloração vermelha na cabeça e verde no acrossoma (corado com FITC-PNA);
- c) Membrana íntegra com acrossoma reagido: ausência de coloração na cabeça e presença de coloração verde no acrossoma (corado apenas com FITC-PNA).
- d) Membrana íntegra com acrossoma íntegro: ausência de coloração na cabeça e acrossoma - visualizado apenas no contraste de fase (Figura 5).

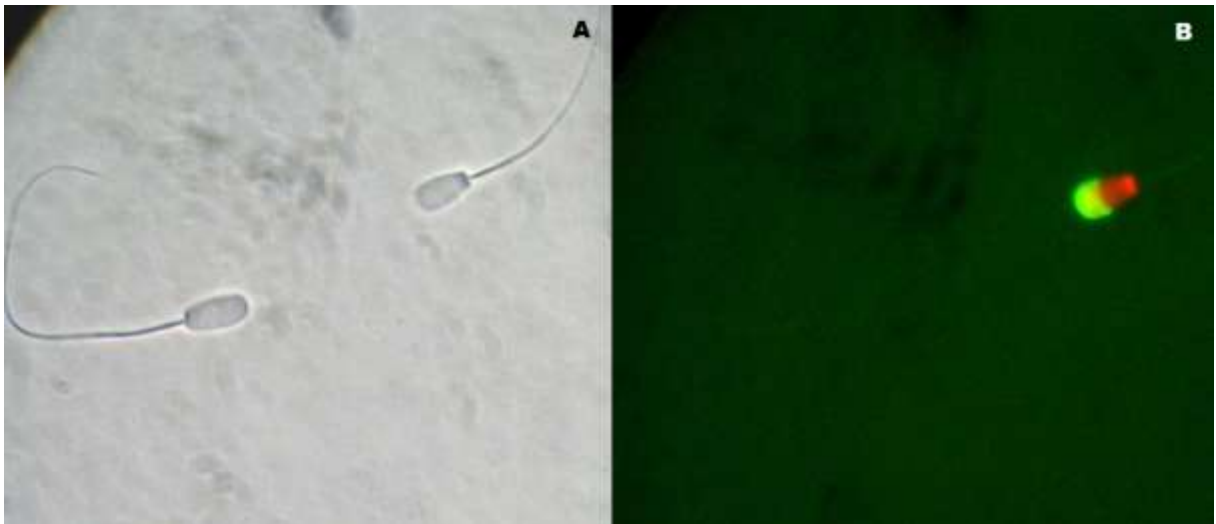


Figura 5 Fotografia do mesmo campo de leitura analisado em contraste de fase (A) e epifluorescência (B). O espermatozoide da esquerda no contraste de fase (A) não apresenta-se corado com FITC-PNA ou Iodeto de propídio (B) portanto sua membrana está íntegra e não há reação acrossomal; O espermatozoide da direita (A) apresenta-se corado de vermelho com iodeto de propídio na região da cabeça e de verde com FITC-PNA no acrossoma (B) denotando que sua membrana apresenta-se lesionada e há reação acrossomal (Fonte: Carvalho, 2009)

4.7 Avaliação da incorporação das NPM e da ultraestrutura espermática

Foi utilizado microscopia de transmissão eletrônica para avaliar os possíveis efeitos morfológicos nos espermatozoides decorrentes da exposição às NPM, bem como a internalização destas nanopartículas. Depois de feitas todas as análises (até 4 horas), o volume de sêmen restante em cada tratamento foi fixado separadamente em Karnovisky (2,5% glutaraldeído, 2% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2) por 24h em geladeira. Após a fixação as amostras foram centrifugadas e colocadas em tampão cacodilato de sódio (0,1M, pH 7,2). Subseqüentemente, as amostras foram pós-fixadas em 1% tetróxido de ósmio, 0,8% ferricianeto de potássio e 5mM cloreto de cálcio, contrastadas em bloco em 0,5% de acetato de uranila, desidratadas em concentrações crescentes de acetona e embebidas em resina Spurr. Os cortes semi-finos foram corados com azul de toluidina para localização dos espermatozoides. Cortes ultra-finos foram avaliados em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol 1011, Jeol, Tóquio, Japão).

4.8 Avaliação estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas entre os grupos e tempos pelo teste *Tukey* a um nível de significância fixado em 5%. As avaliações foram feitas separadamente para todas as características seminais. Utilizou-se o programa estatístico StatView 5.0 para *Windows* (SAS Institute, Cary, Carolina do Norte, Estados Unidos) para as análises.

5. RESULTADOS

A concentração espermática média utilizada nos grupos tratados e no controle foi de $13,44 \pm 3,12 \times 10^6$ espermatozoides/mL. A Tabela 2.2 mostra as médias e desvio padrão de motilidade e motilidade progressiva dos tratamentos ao longo do tempo. Observa-se que em todos os grupos há uma redução significativa ($p < 0,05$) dos parâmetros com o aumento do período de incubação. No entanto, não há variação significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos no mesmo tempo de avaliação (Figura 6).

As demais características espermáticas avaliadas pelo sistema CASA apresentaram comportamento semelhante, não havendo influência dos tratamentos. Desta forma, os dados foram agrupados em um único gráfico, para avaliar o padrão de comportamento do movimento da célula espermática durante o período de incubação. A Figura 7 mostra a influência do tempo nas características qualitativas do movimento espermático. Não há diferença significativa ao longo do tempo ($p > 0,05$) para a característica de STR. Já BCF e ALH apresentam redução significativa ao longo do tempo ($p < 0,05$). Para a análise de LIN observa-se que há diferença entre tempos ($p < 0,05$), no entanto não há diferença entre o valor médio inicial e o final (após o fim da incubação). A Figura 8 mostra a redução da velocidade do deslocamento da célula espermática observada durante o período de incubação do sêmen. Os valores médios de VCL, VAP e VSL mostram uma diminuição ($p < 0,05$) ao longo do tempo de incubação.

Tabela 2 Motilidade e motilidade progressiva de espermatozoides bovinos ao longo do tempo após incubação com fluido magnético composto por nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA.

Tempo (min) ⁶	CO ²		G0,015 ³		G0,03 ⁴		G0,06 ⁵	
	Motilidade	Mot. Progressiva ¹	Motilidade	Mot. Progressiva	Motilidade	Mot. Progressiva	Motilidade	Mot. Progressiva
0	73,2 ± 13,1 ^a	60,2 ± 15,4 ^a	76,4 ± 6,9 ^a	64,1 ± 6,0 ^a	74,9 ± 7,3 ^a	55,1 ± 22,4 ^a	76,1 ± 5,2 ^{ab}	61,9 ± 17,5 ^a
15	73,1 ± 9,1 ^{ab}	58,0 ± 8,7 ^{ab}	73,3 ± 7,1 ^a	59,8 ± 6,7 ^{ab}	71,7 ± 7,6 ^{ab}	57,4 ± 9,8 ^a	79,7 ± 6,1 ^b	65,1 ± 7,9 ^a
30	65,2 ± 13,0 ^{ab}	50,4 ± 13,4 ^{abc}	69,7 ± 9,8 ^{ab}	55,0 ± 10,0 ^{abc}	70,1 ± 10,0 ^{ab}	54,6 ± 9,8 ^a	77,8 ± 9,2 ^{ab}	63,3 ± 8,6 ^a
45	64,3 ± 12,4 ^{ab}	52,3 ± 10,5 ^{abc}	69,4 ± 6,5 ^{ab}	54,7 ± 7,5 ^{abc}	65,2 ± 9,5 ^{ab}	51,2 ± 10,2 ^a	73,9 ± 10,3 ^{ab}	57,2 ± 10,5 ^a
60	61,3 ± 12,3 ^{abc}	47,8 ± 13,0 ^{abcd}	65,9 ± 8,7 ^{ab}	53,0 ± 9,6 ^{abc}	64,7 ± 8,9 ^{ab}	51,8 ± 10,4 ^a	70,7 ± 13,2 ^{ab}	57,2 ± 14,4 ^a
75	63,0 ± 6,8 ^{ab}	50,2 ± 7,8 ^{abc}	63,1 ± 12,1 ^{ab}	49,3 ± 11,3 ^{abcd}	64,6 ± 12,0 ^{ab}	50,5 ± 12,4 ^a	65,1 ± 14,5 ^{abc}	52,2 ± 13,4 ^{ab}
90	58,8 ± 13,2 ^{abc}	47,0 ± 13,4 ^{abcd}	63,7 ± 13,1 ^{ab}	51,7 ± 13,5 ^{abc}	63,7 ± 10,9 ^b	48,4 ± 11,7 ^a	65,1 ± 17,9 ^{abc}	50,8 ± 16,9 ^{ab}
105	55,2 ± 9,0 ^{bc}	41,2 ± 8,7 ^{bcde}	60,7 ± 10,3 ^{ab}	47,4 ± 12,1 ^{bcde}	56,1 ± 13,4 ^{bc}	42,7 ± 11,9 ^{abc}	60,6 ± 16,6 ^{abc}	45,6 ± 16,6 ^{abc}
120	56,0 ± 9,8 ^{abc}	39,9 ± 10,1 ^{cde}	55,1 ± 13,0 ^{bc}	38,8 ± 12,8 ^{cde}	55,0 ± 14,38 ^{bc}	38,6 ± 13,3 ^{abc}	58,2 ± 16,9 ^{bc}	44,7 ± 15,7 ^{abc}
180	40,6 ± 13,1 ^{cd}	26,8 ± 8,6 ^{de}	40,4 ± 13,0 ^d	30,4 ± 12,3 ^{de}	37,0 ± 15,7 ^{cd}	25,8 ± 14,3 ^{bc}	45,6 ± 14,6 ^{cd}	30,2 ± 14,0 ^{bc}
240	31,8 ± 15,7 ^c	23,3 ± 14,5 ^e	32,2 ± 12,4 ^d	21,8 ± 11,8 ^e	27,0 ± 15,8 ^d	18,6 ± 15,4 ^c	33,0 ± 15,3 ^d	22,8 ± 16,1 ^c

^{a-e} letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05); Os resultados estão expressos pela média ± desvio padrão; ¹Mot. Progressiva - motilidade progressiva; ²CO – grupo controle sem adição de fluido magnético; ³G0,015 – grupo com adição 0,015 mg/mL de Fe; ⁴G0,03 grupo com adição de 0,03 mg/mL de Fe; ⁵G0,06 – Grupo com adição de 0,06 mg/mL de Fe. ⁶min-minutos

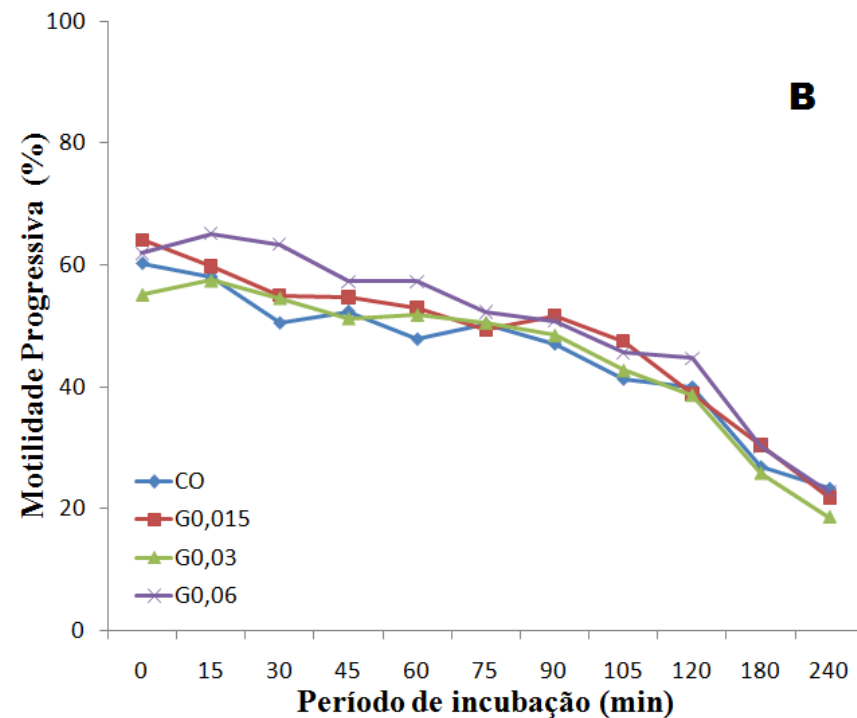
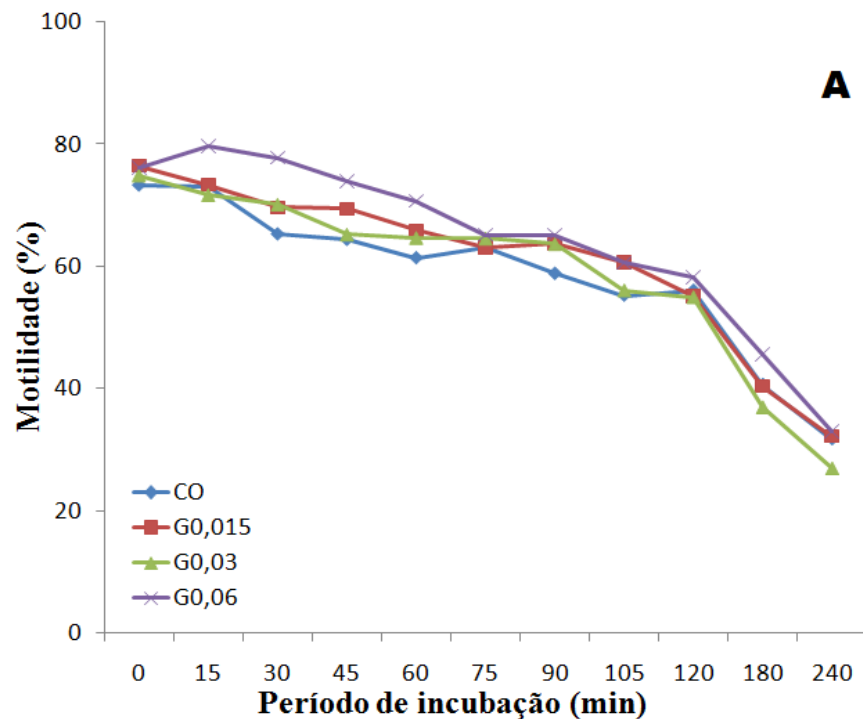


Figura 6 Motilidade (A) e motilidade progressiva (B) dos grupos tratados com nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA e do grupo controle, durante o período de incubação (240 minutos). Observa-se que para as duas características não ocorreram variações entre tratamentos ($p > 0,05$); CO – grupo controle sem adição de fluido magnético; G0,015 – grupo com adição 0,015 mg/mL de Fe; G0,03 grupo com adição de 0,03 mg/mL de Fe; G0,06 – Grupo com adição de 0,06 mg/mL de Fe.

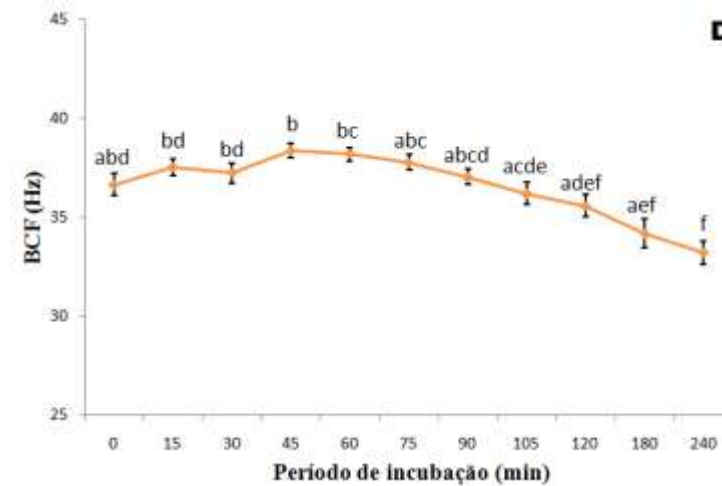
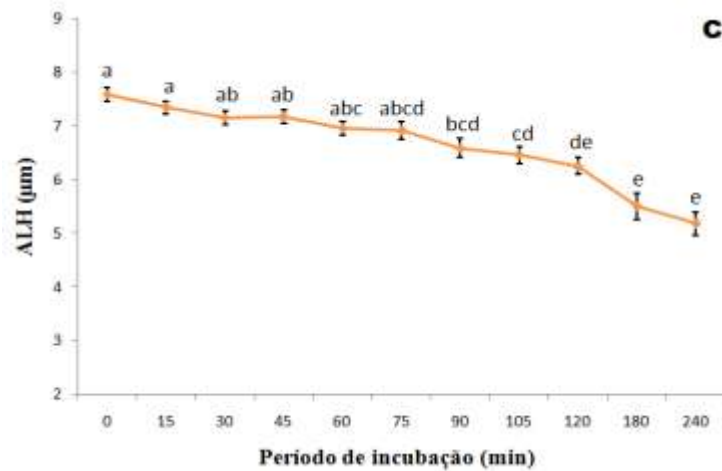
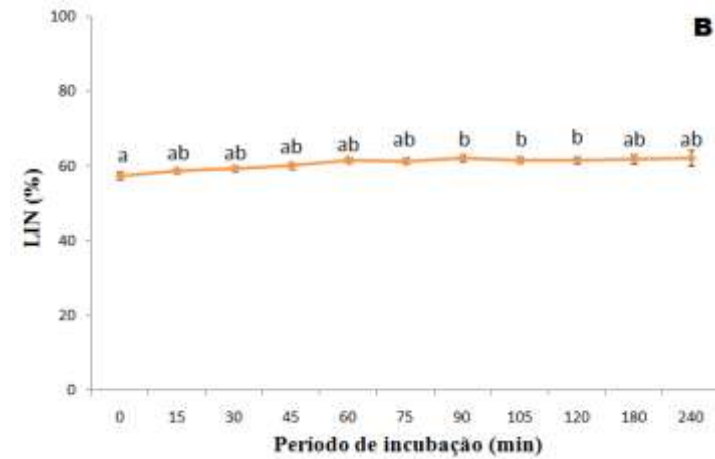
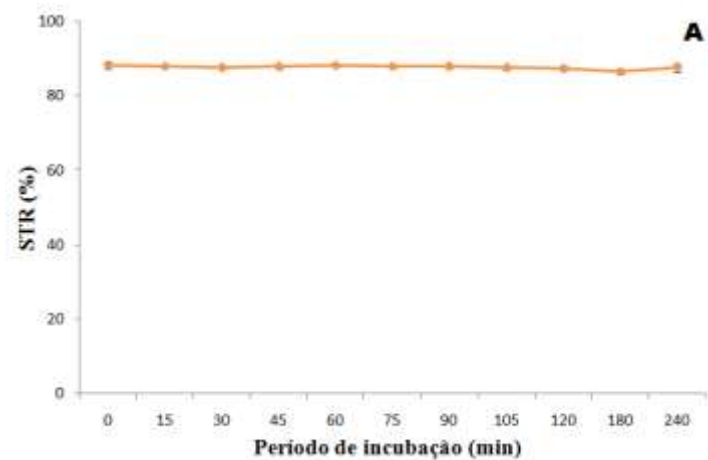


Figura 7 Características qualitativas do movimento espermático (média ± erro padrão) ao longo de 240 minutos de incubação em meio SP-TALP+. Em (A) está representado o parâmetro de retilinearidade, em (B) de linearidade, em (C) da amplitude do deslocamento lateral da cabeça e em (D) do batimento flagelar cruzado. ^{a-e} Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05).

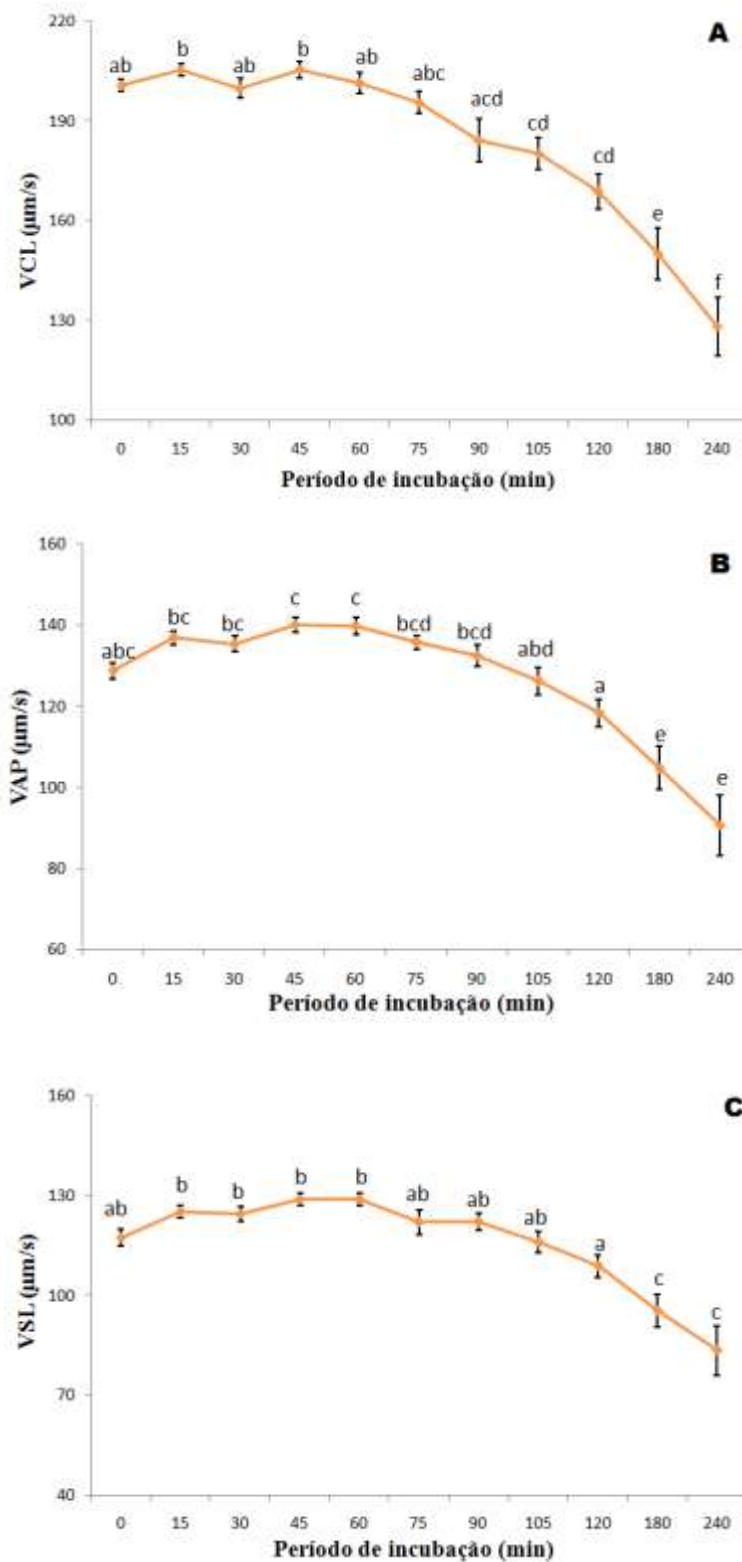


Figura 8 Características quantitativas do movimento espermático (média \pm erro padrão) ao longo de 240 minutos de incubação em meio SP-TALP+. Em (A) está representado a velocidade curvilinear, em (B) a velocidade em linha reta e em (C) a velocidade média do percurso. ^{a-e}Letras diferentes indicam diferença significativa ($P < 0,05$).

Nas análises de integridade da membrana e reação acrossomal, observou-se a presença de aglomerados de nanopartículas magnéticas se encontravam principalmente na região da cabeça dos espermatozoides. Nas Figuras 9,10 e 11 estão representados os resultados do teste de fluorescência referentes à integridade da membrana plasmática e reação acrossomal. Os tipos espermáticos encontrados no teste foram interpretados conforme o significado fisiológico e foram separados em três diferentes classes: 1) Espermatozoides viáveis (espermatozoides com membrana intacta e que não apresentaram reação acrossomal) representam a porcentagem em relação ao total de células contadas; 2) Espermatozoides com membrana íntegra e que sofreram reação acrossomal, esta classe representa a porcentagem em relação ao total de células com membrana íntegra, e 3) Espermatozoides com membrana lesada, representa a porcentagem de células com membrana lesada (com ou sem reação acrossomal) em relação ao total de células contadas.

Observa-se que não há diferença entre grupos nos tempos analisados em nenhuma das classes espermáticas analisadas ($p > 0,05$). Após 2 horas de incubação, observa-se que todos os grupos reduzem significativamente a porcentagem de células viáveis (Figura 9). Além disso, os grupos CO, G0,03 e G0,06 apresentaram aumento significativo de células com membrana lesada após 2 horas de incubação (Figura 10). Em relação às células com membrana íntegra que sofreram reação acrossomal, somente G0,03 apresentou um aumento significativo após 2 horas de incubação (Figura 11).

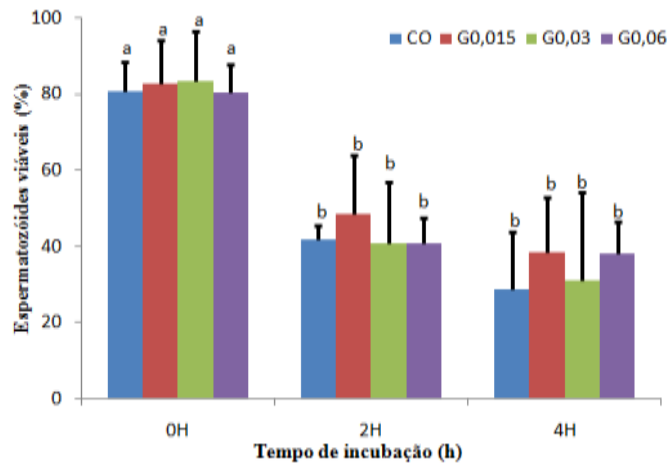


Figura 9 Viabilidade dos espermatozoides ao longo do tempo de exposição às nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA. Os resultados estão expressos em porcentagem ^{a-b}Letras diferentes em um mesmo grupo representam a diferença entre tempos ($p < 0,05$); Barras indicam o desvio padrão. Não foi observada diferença significativa entre grupos em um mesmo tempo de avaliação. CO – grupo controle sem adição de fluido magnético; G0,015 – grupo com adição 0,015 mg/mL de Fe; G0,03 grupo com adição de 0,03 mg/mL de Fe; G0,06 – Grupo com adição de 0,06 mg/mL de Fe.

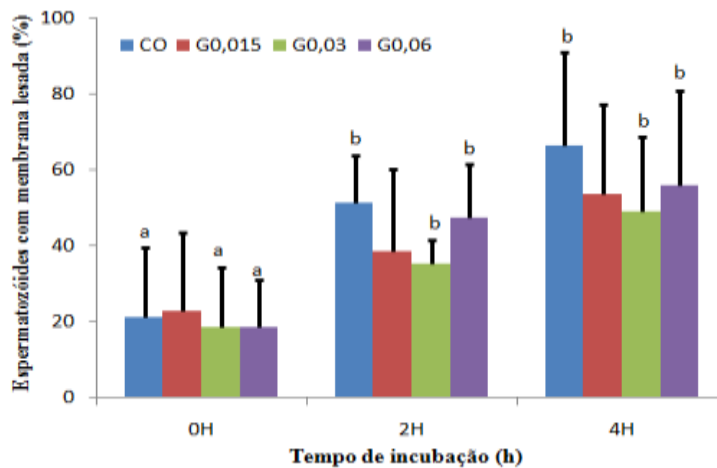


Figura 10 Espermatozoides com membrana lesada ao longo do tempo de exposição às nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA. Os resultados estão expressos em porcentagem ^{a-b}Letras diferentes em um mesmo grupo representam a diferença entre tempos ($p < 0,05$); Barras indicam o desvio padrão. Não foi observada diferença significativa entre grupos em um mesmo tempo de avaliação. CO – grupo controle sem adição de fluido magnético; G0,015 – grupo com adição 0,015 mg/mL de Fe; G0,03 grupo com adição de 0,03 mg/mL de Fe; G0,06 – Grupo com adição de 0,06 mg/mL de Fe.

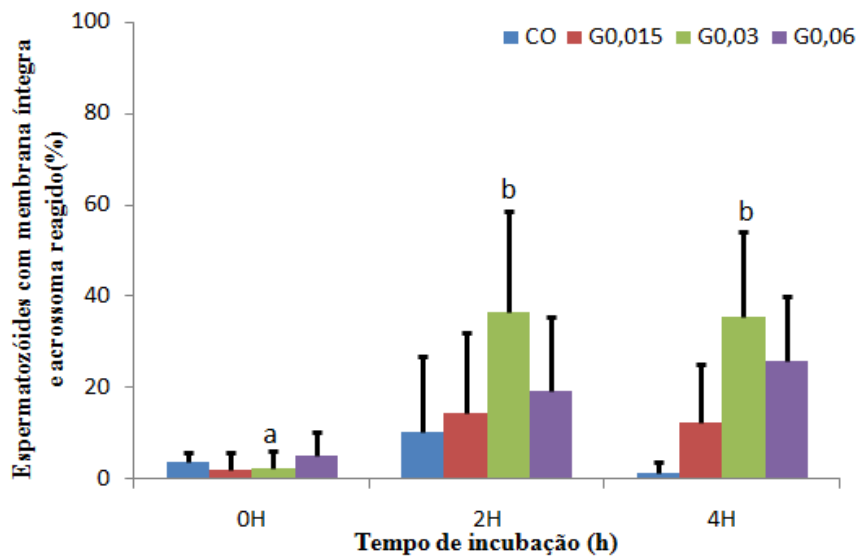


Figura 11 Espermatozoides com membrana íntegra e acrossoma reagido ao longo do tempo de exposição às nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA. Os resultados estão expressos em porcentagem. ^{a-b}Letras diferentes em um mesmo grupo representam a diferença entre tempos ($p < 0,05$); Barras indicam o desvio padrão. Não foi observada diferença significativa entre grupos em um mesmo tempo de avaliação. CO – grupo controle sem adição de fluido magnético; G0,015 – grupo com adição 0,015 mg/mL de Fe; G0,03 grupo com adição de 0,03 mg/mL de Fe; G0,06 – Grupo com adição de 0,06 mg/mL de Fe.

As imagens de microscopia eletrônica (Figura 12) mostram a formação dos aglomerados de nanopartículas magnéticas (setas) nos grupos tratados, próximos da região da cabeça dos espermatozoides. Observou-se ainda que em todos os tratamentos, grande parte dos espermatozoides analisados apresentou membrana plasmática rompida (Figura 13). Não foram observadas alterações nas estruturas da célula espermática em função do tratamento. Em nenhum dos grupos tratados foi observada a presença das nanopartículas no citoplasma dos espermatozoides, indicando que não houve internalização do nanomaterial pela célula.

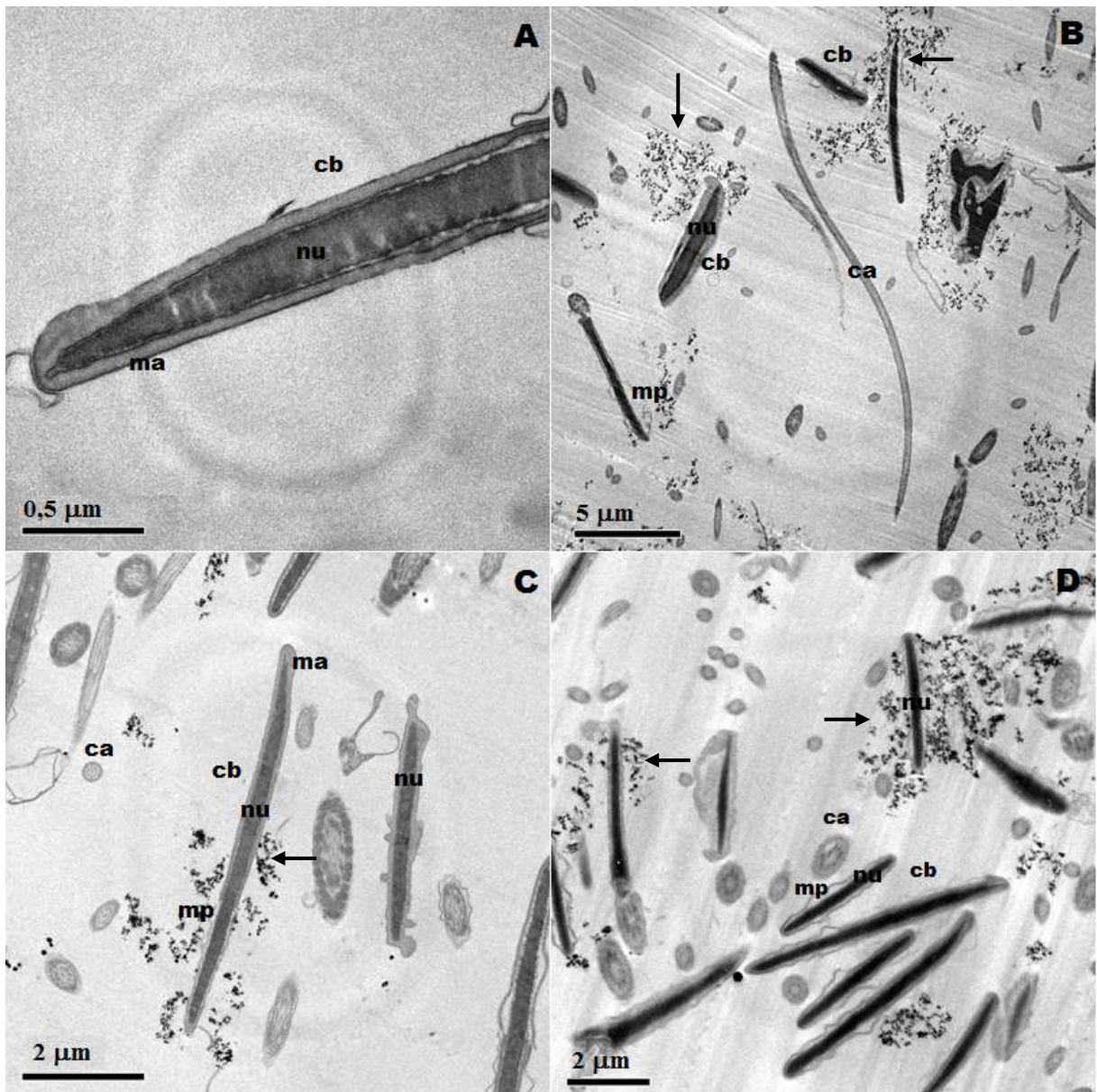


Figura 12 Foto da microscopia eletrônica de transmissão para o grupo CO (A), G0,06 (B), G0,03 (C) e G0,015 (D) após 4 horas de incubação. As setas indicam aglomerados de nanopartículas de maghemita próximos a região da cabeça dos espermatozoides. Não há evidência de internalização das partículas pelos espermatozoides. (ma: membrana acrossomal; mp: membrana plasmática; nu: núcleo; cb: cabeça; ca: cauda)

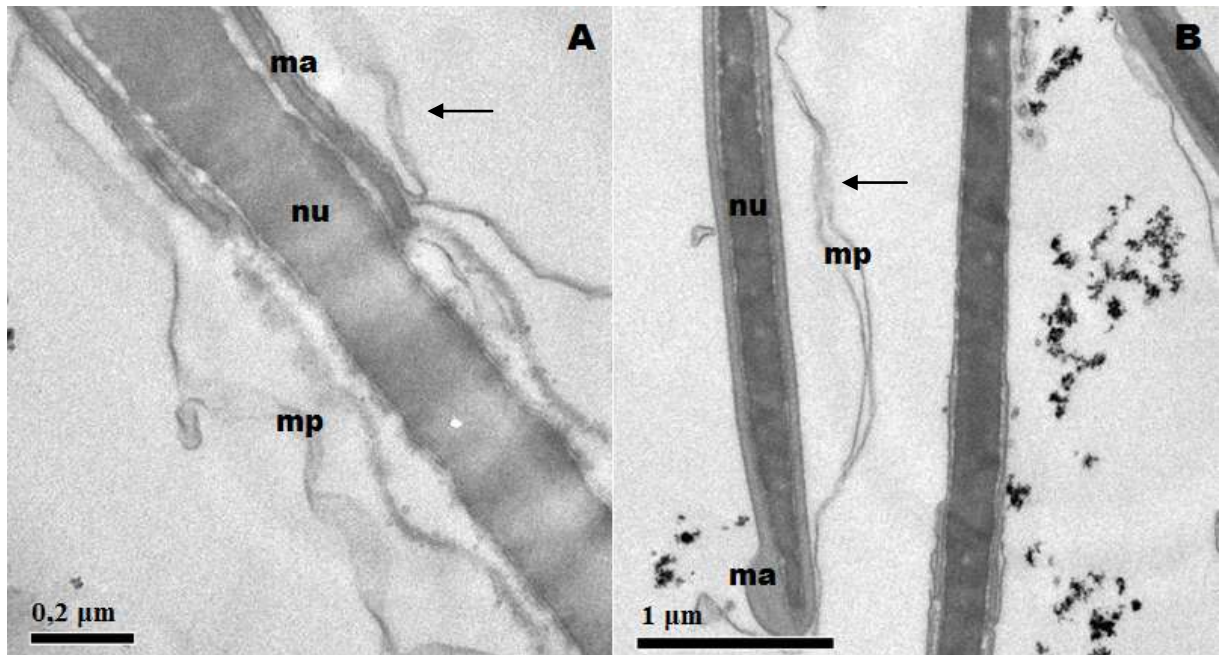


Figura 13 Foto da microscopia eletrônica de transmissão de espermatozoides do grupo CO (A) e do grupo G0,03 tratado com nanopartícula de maghemita (B) após 4 horas de incubação. As setas indicam o rompimento de membrana plasmática. (mp: membrana plasmática; nu: núcleo; cb: cabeça; ca: cauda)

6. DISCUSSÃO

Estudos de toxicidade são realizados utilizando-se de testes específicos para avaliar os possíveis efeitos das nanopartículas magnéticas nas estruturas biológicas. Para a escolha dos testes utilizados, deve-se levar em consideração o tipo celular estudado e sua função biológica (Lewinski et al., 2008). Desta forma, para determinar o efeito das nanopartículas magnéticas no sêmen é preciso utilizar testes que avaliem a cinética espermática e a integridade de suas membranas a fim de estimar se a viabilidade do espermatozoide (Silva et al., 2009) pode ser afetada pela exposição às partículas.

O processo de congelamento promove crioinjúrias à célula espermática e, conseqüentemente, reduz a motilidade da amostra seminal, podendo afetar a avaliação da viabilidade espermática. Desta forma, a utilização do gradiente de *Percoll* após o descongelamento do sêmen é importante para separar as células danificadas das células viáveis, permitindo uma amostragem mais próxima de um ejaculado *in natura*. Estudos utilizando o mesmo tipo de seleção espermática utilizada neste experimento mostram que a motilidade da amostra seminal de bovinos pode aumentar atingindo valores próximos a 80% após a ressuspensão (Carvalho, et al., 2009; Machado et al., 2009). No presente estudo, a motilidade inicial (zero hora), avaliada após a passagem pelo gradiente de *Percoll*, com ou sem a presença de nanopartícula, foi semelhante para todos os grupos avaliados, com valores entre 73 e 76% de células móveis, corroborando com os valores encontrados na literatura.

Até a primeira hora de incubação, não houve influência do tempo ou do tratamento na motilidade espermática. A partir da segunda hora, no entanto, os valores deste parâmetro passam a ser prejudicados pelo tempo de incubação, não havendo diferença entre os tratamentos. Makhuf et al. (2006) incubaram sêmen bovino com nanopartícula de maghemita recoberta com PVA e concentração de íons de Fe de 7,35 mM. Da mesma forma os autores não observaram influencia da partícula na motilidade espermática. No entanto, contrastando com os resultados deste experimento, não foi observado redução da motilidade (mantida em torno de 70%) após quatro horas de incubação em condição de capacitação. É importante considerar que a redução do percentual de células móveis é esperada após o TTR, e é validado como teste de avaliação da qualidade da amostra seminal, desde que os valores de motilidade não estejam abaixo de 15% após a terceira hora de incubação (CBRA, 1998).

No presente estudo, os valores na terceira e quarta hora estiveram em torno de 40 e 30% em todos os grupos, respectivamente. O resultado contrastante de Makhluף et al. (2006) pode ser devido a forma de avaliação da motilidade e ao meio de incubação utilizado, os quais não foram detalhados pelos autores. Wiwanitkit et al. (2007) utilizando solução de nanopartículas de ouro em contato direto com sêmen humano por 15 minutos observaram que 25% das células observadas na amostra com a partícula não eram móveis, enquanto o grupo controle manteve uma motilidade de 95%. A redução da motilidade minutos depois do contato com a partícula pode ser devida à ausência de cobertura orgânica da nanopartícula que pode ser mais tóxica para as estruturas biológicas (Gupta & Gupta, 2005).

A motilidade progressiva também não foi influenciada pelo tratamento com a partícula, somente ao longo do tempo observou-se uma redução dos valores deste parâmetro de forma semelhante em todos os grupos. Não há relatos da influência das nanopartículas sobre a motilidade progressiva e os valores encontrados estão dentro do esperado para sêmen descongelado (CBRA, 1998). É importante ressaltar que este é o primeiro trabalho utilizando análise computadorizada do movimento espermático após contato com nanopartículas magnéticas.

Os demais parâmetros que caracterizam o movimento espermático analisados pelo sistema CASA também não foram influenciados pelo tratamento com as nanopartículas de maghemita, por isso os dados foram agrupados para avaliar o padrão de comportamento do movimento da célula espermática durante o período de incubação. Nota-se que após passagem pelo gradiente de *Percoll* os valores de VCL, VAP, VSL, ALH e LIN (Figuras 7 e 8) estão altos quando comparados aos valores observados por Carvalho (2009) que utilizou a mesma técnica de separação espermática e avaliação computadorizada (VCL: $4,4 \pm 0,2 \mu\text{m/s}$, VAP: $61,6 \pm 1 \mu\text{m/s}$, VSL $61,6 \pm 1 \mu\text{m/s}$, ALH $4,6 \pm 0,8 \mu\text{m}$ e LIN $52,9\% \pm 1,4$). Esse padrão observado no presente experimento corrobora com os valores descritos por Gillan et al. (2008) para espermatozóide hiperativado. A hiperativação é uma consequência do processo de capacitação espermática e o seu papel fisiológico pode ter relação com a liberação do espermatozoide das reservas do epitélio uterino ou, ainda, com a impulsão do espermatozoide para ultrapassar as células do *cumulus*. Essa alteração ocorre após um aumento de fluidez da membrana plasmática do espermatozoide em consequência da perda de moléculas de colesterol. A albumina promove a extração do colesterol da membrana plasmática, através do deslocamento de fosfolípidos e rearranjo da arquitetura celular, exercendo um importante

papel no processo de capacitação e, conseqüentemente, promovendo a hiperativação (Mortimer, 1997). Suarez & Osman (1987) observaram que a adição de albumina aos meios de cultivo espermático induziu a hiperativação dos espermatozoides de ratos. Desta forma, acredita-se que a adição de albumina ao meio SP-TALP, para atingir a concentração de 1,5%, com o intuito de promover a estabilização da nanopartícula (Braz, 2011), desencadeou a hiperativação das células espermáticas observada através dos parâmetros do CASA. Deve-se considerar, no entanto, que esse processo não é desejável após o descongelamento, uma vez que a hiperatividade deve ocorrer próximo ao local de fertilização. Portanto, essa ativação precoce pode reduzir a vida útil do espermatozoide e, conseqüentemente, reduzir a capacidade fecundante da amostra seminal (Silva et al., 2009).

A viabilidade da célula espermática também deve ser analisada através da integridade de sua estrutura e da manutenção de suas funções. No presente estudo, os dados fornecidos pela associação de corantes fluorescentes permitiram a determinação de um grupo de células viáveis, uma vez que mantiveram a membrana plasmática íntegra e não sofreram reação acrossomal (processo que deve ocorrer apenas no momento da fecundação). A viabilidade do espermatozoide é importante para a manutenção da sua capacidade de fecundar um ovócito. Observou-se que o tratamento com a nanopartícula não influenciou a porcentagem de células viáveis. Somente sendo observada diferença significativa ao longo do tempo dentro de um mesmo tratamento. Essa queda na porcentagem de células viáveis, juntamente com a redução da motilidade da amostra, é esperada devido ao processo de incubação a que o sêmen foi submetido, tanto que o mesmo padrão também foi observado no grupo controle sem contato com as NPM de maghemita. Kim et al. (2010) observaram que a capacidade fecundante dos espermatozoides após exposição às NPM não foi afetada. Os autores incubaram o espermatozoide com nanopartículas magnéticas a base de óxido de ferro para posterior fertilização *in vitro* com o intuito de incorporação do gene exógeno para produção de animais transgênicos. A produção do embrião transgênico após a utilização da nanopartícula como carreadora de DNA exógeno demonstra que a NPM não influencia a capacidade fecundante do espermatozoide. No presente estudo, os resultados obtidos para cinética espermática e integridade de membrana sugerem que a viabilidade espermática também foi mantida após incubação com a nanopartícula.

Estudos *in vitro* com diversos tipos celulares diversas também são comumente utilizados para avaliar o potencial tóxico das nanopartículas, levando-se em consideração o

efeito do nanomaterial na viabilidade celular. Auffan et al. (2006) relatam o efeito das nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA na viabilidade de fibroblasto humano avaliada através de testes da integridade da função mitocondrial. Em concentração semelhante à deste experimento, foi observada a redução da viabilidade celular na segunda e quarta horas de incubação não sendo observada na sexta hora e com aumento da atividade mitocondrial na 24^a e 48^a horas. Os autores relacionaram esse comportamento ao processo de internalização das nanopartículas pela célula, que pode promover uma redução da atividade dos componentes celulares a fim de evitar os efeitos deletérios do contato com a partícula. Embora não tenha sido relatado, é possível que o aumento da atividade mitocondrial possa ter relação com a proliferação dos fibroblastos no meio de cultivo. Os efeitos das NPM de maghemita recobertas com DMSA também já foram estudados após o contato com diferentes linhagens de macrófagos. Sestier et al. (2002) utilizaram linhagem de macrófago humano e de ratos e observaram maior queda da viabilidade na linhagem do roedor que na linhagem humana, em ambos os casos o efeito foi dose-dependente. No entanto, para macrófagos do conteúdo bronco-alveolar de ratos (tratados com NPM por via endovenosa) não foi observado efeito tóxico da partícula mesmo após comprovada a internalização pela célula (Valois et al., 2010). Os autores relacionaram essa diferença de comportamento após contato com as partículas com a diferença na linhagem celular utilizada nos experimentos. Outro estudo, com linhagem de célula PC12 observou-se que NPM de maghemita recoberta com DMSA reduz a viabilidade e aumenta a morte celular à medida que a concentração da partícula e o tempo de exposição aumentam. Além disso, houve redução da resposta da célula na extensão de neuritos após estímulo com fator de crescimento neuronal (NGF), demonstrando que a partícula afeta a funcionalidade e a estrutura celular (Pisanic et al., 2007). É possível perceber que avaliações utilizando o mesmo tipo de NPM e cobertura orgânica acarretam diferentes padrões de respostas em relação à viabilidade celular. Deve-se considerar, ainda, que o espermatozoide é uma célula estrutural e funcionalmente atípica quando comparada às demais linhagens celulares, dificultando a comparação dos resultados. Além disso, as características intrínsecas da nanopartículas, tais como tamanho primário, forma, carga elétrica, concentração, estado de oxidação, área de superfície e estado de aglomeração podem afetar a resposta das células à presença das NPM, afetando os resultados e a comparação dos estudos, mesmo com partículas semelhantes (Mahmoudi et al., 2009; Auffan, et al., 2009).

Outra importante função do espermatozoide é a reação acrossomal. Este processo deve ocorrer apenas no momento da fecundação (Garner & Hafez, 2004), mas é importante avaliar se essa função espermática é afetada pelo contato com a nanopartícula. Observou-se no presente experimento que não houve influência das nanopartículas de maghemita recobertas com DMSA no percentual de células com reação acrossomal. Para avaliar a integridade dessa função espermática após contato com NPM de maghemita recobertas com PVA, Makhluף et al. (2006) induziram a RA em espermatozoides bovinos incubados com as nanopartículas. Os autores relatam que o grupo tratado com a NPM apresentou quantitativo de células reagidas semelhante ao grupo não tratado e inferindo, com o resultado, que as NPM não afetam os receptores espermáticos relacionados a esta função.

Através das imagens de microscopia eletrônica observou-se maior incidência de aglomerados de NPM próximos à região da cabeça do espermatozoide, essa tendência também foi observada na microscopia de epifluorescência/contraste de fase. Esse mesmo padrão foi descrito por Makhluף et al. (2006) e Wiwanitkit et al. (2007), mas em ambos os casos os autores afirmam que os aglomerados também se concentravam na região da cauda. Essa aglomeração na região da cabeça pode ser devido à presença do núcleo do espermatozoide neste local, uma vez que pode haver uma tendência de aglomeração de NPM no núcleo celular (Pisanic et al., 2007).

A internalização de nanopartículas não foi observada nas imagens de microscopia eletrônica. Makhluף et al. (2006), em contrapartida, relatam que após 1,5h de incubação as NPM de maghemita com PVA foram internalizadas pelos espermatozoides sendo que parte das partículas estavam associadas a organelas presentes no citoplasma. Os autores afirmam que a internalização das partículas pelo espermatozoide pode ocorrer através do mecanismo de endocitose de fase fluida (pinocitose), que carrega líquidos e partículas diluídas para o meio intracelular (Karp, 2005). A pinocitose das NPM pelo espermatozoide pode ser favorecida com o uso do PVA como revestimento das NPM (Makhluף et al. 2006). Desta forma, o DMSA utilizado no presente experimento pode ter efeito contrário ao PVA, não favorecendo o processo de internalização das NPM. No entanto, a presença intracitoplasmática de nanopartículas recobertas com DMSA já foi descrita em macrófagos (Valois et al., 2010), linhagem de células de feocromocitoma (Pisanic et al., 2007) e fibroblastos (Auffan et al., 2006). Portanto, o processo de internalização pode ter relação tanto

com o revestimento orgânico, quanto com as características químicas e físicas das nanopartículas utilizadas (Wilhelm et al., 2003).

Não foi observado alterações ultraestruturais na célula espermática após o contato com nanopartículas magnéticas. Ao contrário, Wiwanitkit et al. (2007) relatam que a exposição do sêmen humano às nanopartículas de ouro promove alterações na ultraestrutura da célula espermática. Como dito anteriormente, a ausência de cobertura biocompatível pode ter relação com a degradação celular descrita pelos autores. As imagens de microscopia eletrônica mostram ainda que em todos os grupos, tratados ou não com NPM, grande parte das células apresentaram membranas rompidas. No entanto, deve-se considerar que as amostras para avaliação ultraestrutural foram retiradas após quatro horas de incubação, sendo esperado esse tipo de alteração. Além disso, o teste de integridade de membrana mostra estatisticamente que ocorre um aumento de células com membranas lesadas na quarta hora de incubação.

7. CONCLUSÃO

A exposição espermáticas ao fluido magnético composto por nanopartículas de maghemita revestidas com DMSA nas concentrações 0,015 mg de Fe/mL, 0,03 mg de Fe/mL e 0,06 mg de Fe/mL não afeta a cinética espermática de espermatozoides bovinos avaliada pelo sistema CASA, não exerce influência na quantidade de espermatozoides viáveis e de espermatozoides com reação acrossomal e não acarreta lesões ultraestruturais. Em nenhuma das concentrações mencionadas foi observada a internalização das partículas pelos espermatozoides.

7.1 Considerações finais

A utilização de nanopartículas magnéticas pode ser ampliada para as mais diversas áreas das ciências, tais como a reprodução assistida. Pode-se utilizar essa tecnologia em técnicas mais elaboradas, como a transfecção de genes guiadas por espermatozoide para produção de animais transgênicos e em técnicas mais simples como a separação espermática. O presente estudo possibilitou avaliar o efeito de nanopartículas sobre células espermáticas através de testes que auxiliam na mensuração da manutenção da capacidade fecundante de uma amostra seminal após a exposição ao nanomaterial. As nanopartículas de maghemita revestidas com DMSA dispersas em fluido magnético não exerceram influencia nas características seminais de motilidade e integridade de estruturas e funções, bem como não acarretou lesões ultraestruturais à célula espermática. Além disso, nas condições do experimento as nanopartículas não foram internalizadas pelo espermatozoide. Desta forma, o fluido magnético composto por nanopartículas de maghemita revestidas com DMSA podem ser utilizados diretamente em amostras seminais nas diversas biotécnicas reprodutivas uma vez que não afetam o potencial fecundante do espermatozoide.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUFFAN, M.; ROSE, J.; WIESNER, M. R., BOTTERO, J. Y. Chemical stability of metallic nanoparticles: A parameter controlling their potential cellular toxicity in vitro. **Environmental Pollution** v. 157, p. 1127-1133, 2009.
- AUFFAN, M.; DECOME, L.; ROSE, J.; ORSIERE, T.; MEO, M.; BRIOIS, V.; CHANEAC, C.; OLIVI, L.; BERGE-LEFRANC, J. L.; BOTTA, A.; WIESNER, M. R., BOTTERO, J. Y. DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: A physicochemical and cytogenotoxic study **Environment, Science and Technology** v. 40 p. 4367-4373, 2006;
- BRAZ, J.M. **Efeitos das nanopartículas magnéticas a base de maghemita recobertas com ácido 2,3-dimercaptosuccínico em macrófagos de camundongos** Brasília: Instituto de Ciências biológicas, Universidade de Brasília, 108 p. Dissertação de Mestrado, 2011
- CARVALHO, J.O. **Avaliação da qualidade do espermatozoide bovino criopreservado após sexagem por citometria de fluxo e sua utilização na produção *in vitro* de embriões.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 91p. Dissertação de Mestrado, 2009.
- CARVALHO, J.O.; SARTORI, R.; LEMES, A.P., MOURÃO, G.B.; DODE, M.A.N. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.44, n.10, p.1346-1351, 2009;
- CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação do sêmen animal.** 2ª Ed. Belo Horizonte:Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 49p. 1998;
- GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozoides e plasma seminal. In: HAZEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**, 7ed. Manole: São Paulo. p. 97-110, 2004;
- GILLAN, L., KROETSCH, T., CHIS MAXWELL, W.M., EVANS, G. Assessment of in vitro sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 201-214, 2008;
- GUPTA, A.K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications **Biomaterials** v. 26, p. 1565-1573, 2005;
- KARP, G. Sistema de membranas citoplasmáticas: Estrutura, função e tráfego de membranas. In: *Biologia celular e molecular*. Ed. Manole, Barueri, São Paulo, 2005 Disponível em: <http://books.google.com.br> (Acesso em 24/05/2011);
- KIM, T. S.; LEE, S. H.; GANG, G. T.; LEE, Y. S.; KIM, S. U.; KOO, D. B.; SHIN, M. Y.; PARK, C. K.; LEE, D. S. Exogenous DNA uptake of boar spermatozoa by a magnetic nanoparticle vector system **Reproduction in Domestic Animal** v.45, p. 201-206, 2010;
- KLINC, P.; RATH, D. Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 42, p. 63-67, 2007.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles **Small** v.4, n. 1, p.26-49, 2008.

MACHADO, G. M.; CARVALHO, J. O.; SIQUEIRA FILHO, E.; CAIXETA, E. S.; FRANCO, M. M.; RUMPF, R.; DODE, M. A. N. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos **Theriogenology** v. 71, 8, p. 1289-1297, 2009;

MAHMOUDI, M.; SIMCHI, A.; MILANI, A. S.; STROEVE, P. Cell toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticle **Journal of colloid and interface science** v. 336 (2), p. 510-518, 2009;

MAKHLUF, S.B.D.; QASEM, R.; RUBINSTEIN, S.; GEDANKEN, A.; BREITBART, H. Loading magnetic nanoparticles into sperm cells does not affect their functionality. **Langmuir**, v.22, p.9480-9482, 2006.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals **Human Reproduction Update** v. 3, n. 5, p. 403-139, 1997;

PISANIC, T. R.; BLACKWELL, J. D.; SHUBAYEV, V. I.; FIÑONES, R. R.; JIN, S. Nanotoxicity of iron nanoparticle internalization in growing neurons **Biomaterial** v. 28 p. 2572-2581, 2007

SESTIER, C.; LACAVAL, Z. G. M.; LACAVAL, L. M.; DA SILVA, M. F.; AZEVEDO, R. B.; BUSKE, N.; GANSAU, C.; MORAIS, P. C.; SILVA, O.; PELEGRINI, F.; SABOLOVIC, D. In vitro toxicity of magnetic fluids evaluated for macrophage cell lines **Journal of Magnetism and Magnetic Materials** v. 252, p. 403-405 2002;

SILVA, S.V.; BATISTA, A.M., COLETO, Z.F.; GUERRA, M.M.P Diferentes métodos e técnicas na avaliação espermática: uma breve revisão **Ciência Veterinária nos Trópicos** v.12, n. 1/2/3, p. 1-15, 2009;

SUAREZ, S.S. & OSMAN, R.A. Initiation of hyperactivated flagellar bending in mouse sperm within the female reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v.36, p. 1191-1198, 1987.

VALOIS, C. R. A.; BRAZ, J. M.; NUNES, E. S.; VINOLO, M. A. R.; LIMA, E. C. D.; CURI, R.; KUEBLER, W. M.; AZEVEDO, R. B. The effect of DMSA-functionalized magnetic nanoparticles on transendothelial migration of monocytes in the murine lung via β 2 integrin-dependent pathway **Biomaterial** v. 21, p. 366-374, 2010;

WILHELM, C.; BILLOTEY, C.; ROGER, J.; PONS, J.N.; BACRI, J.-C.; GAZEAU, F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating **Biomaterials** v.24, p. 1001-1011, 2003.

WIWANITKIT, V.; SEREEMASPUN, A.; ROJANATHANES, R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report **Fertility and Sterility** v.71, p. 7-8, 2007;