

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**THOMÁS NUNES GONÇALVES DIAS**

**NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO INDOMETACINA  
ADICIONADAS AO DILUENTE DE SÊMEN EQUINO RESFRIADO**

**Porto Alegre  
2017**

**THOMÁS NUNES GONÇALVES DIAS**

**NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO INDOMETACINA NO  
DILUENTE DE SÊMEN EQUINO**

Dissertação apresentada ao PPG em Medicina Animal: Equinos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Reprodução Equina.

Orientador: Adriana Pires Neves

**Porto Alegre  
2017**

**THOMÁS NUNES GONÇALVES DIAS**

**NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO INDOMETACINA NO  
DILUENTE DE SÊMEN EQUINO**

Dissertação apresentada ao PPG em Medicina Animal: Equinos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Reprodução Equina.

Orientador: Adriana Pires Neves

Dissertação defendida e aprovada em:

Banca examinadora:

---

Profa. Dra. Adriana Pires Neves.  
Orientadora

---

Profa. Dra. Adriana Kroef Tarouco  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Eduardo Malschitzky  
Membro da Comissão

---

Profa. Dra. Mara Iolanda Batistella Rubin  
Membro da Comissão

Dedico este trabalho a minha filha Mariana,  
que chegou no decorrer desta etapa  
preenchendo nossas vidas de amor!

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora prof<sup>a</sup>. Adriana Pires Neves, pela disponibilidade e paciência com que me orientou até este momento.

À professora Adriana Raffin Pohlmann, pela coordenação da parte “nano” deste projeto.

À Dra. Denise Jornada e equipe do Laboratório 405 da Faculdade de Farmácia da UFRGS, pela elaboração das nanocápsulas e ensinamentos sobre o assunto.

Ao professor Dr. Rodrigo Costa Mattos, por ter colocado o Laboratório de Reprodução (REPROLAB) a disposição para a realização deste trabalho.

Aos colegas da pós graduação e aos estagiários do REPROLAB que auxiliaram nas coletas e análises, sem vocês nada disto seria possível.

Ao professor Dr. Sergio Santos pela amizade e ajuda com a estatística.

Aos colegas que fizeram parte da minha formação profissional desde o início, Andréa Keller, Liana van der Linden e Yura Torres, vocês são parte inestimável a cada dia de trabalho.

Aos amigos que me acolheram em Porto Alegre e tornaram um pouco minha suas casas: Eduardo, Tiago, Favorino, Gilberto, Vitor e Nathalia, Lidiane e Otávio.

À minha família pelo apoio nos momentos mais difíceis e a minha esposa Lívia pela compreensão e incentivo.

Enfim, a todos os que de uma ou outra forma me ajudaram e apoiaram no decorrer desta jornada vai, de coração, o meu muito obrigado!

“If at first the idea is not absurd, then there is no hope for it.”

Albert Einstein

## RESUMO

Na cadeia produtiva de equinos, um dos pontos onde mais se investe é o melhoramento genético e a biotecnologia da reprodução. No Brasil, a biotécnica mais utilizada atualmente é a inseminação artificial com sêmen fresco ou resfriado. Em algumas éguas, a presença do sêmen pode causar reação inflamatória além da fisiológica, causando endometrite persistente pós cobertura o que torna o ambiente uterino incompatível com a gestação. Com a adição de algum anti-inflamatório ao diluente, poderia o mesmo ser carregado na inseminação. A indometacina é um potente anti-inflamatório, inibidor não seletivo das COX 1 e 2; a apresentação nanoparticulada de diferentes princípios ativos propicia uma melhor disponibilidade do fármaco, a diminuição das doses e conseqüentemente dos efeitos adversos. A utilização dessa forma de anti-inflamatório no sêmen pode ser útil em diminuir a endometrite causada pela exposição do endométrio ao sêmen. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da utilização de nanocápsulas de núcleo lipídico com indometacina (IndOH-LNC), na motilidade, funcionalidade e integridade de membrana do sêmen equino. O sêmen foi diluído pelo padrão de 50 milhões de espermatozoides por mililitro e as nanocápsulas foram acrescidas na concentração de 0,1% com polaridades neutra e positiva. A viabilidade do produto foi testada quanto à motilidade pelo CASA (*computer analysis system assay*), funcionalidade de membrana pelo teste hiposmótico (HOST) e integridade de membrana por teste de fluorescência. As amostras foram examinadas no momento da coleta e pós 24 horas. O teste ANOVA para uma variável (fator), nas comparações realizadas, em nenhuma situação revelou diferença estatística ( $\alpha=0,05$ ), concluindo-se que o sêmen equino tolera a presença de indometacina nanoencapsulada na proporção utilizada neste estudo.

Palavras-Chave: nanocápsulas, núcleo lipídico, indometacina, sêmen, equino.

## ABSTRACT

In the equine productive chain, one of the most invested is the genetic improvement and the biotechnology of reproduction. In Brazil, the most commonly used biotechnology is artificial insemination with fresh or cooled semen. In some mares, the presence of semen may cause inflammatory reaction beyond the physiological, causing persistent post mating endometritis, which makes the uterine environment incompatible with gestation. With the addition of some anti-inflammatory to the diluent, it could be carried at insemination. Indomethacin is a potent anti-inflammatory, non-selective inhibitor of COX 1 and 2; the nanoparticulate presentation of different active principles leads to better drug availability, decreased dosages and consequently adverse effects. The use of this form of anti-inflammatory in semen may be useful in reducing endometritis caused by exposure of the endometrium to semen. This work aimed at the effects of the use of lipid core nanocapsules with Indomethacin (IndOH-LNC) on the motility, functionality and membrane integrity of equine semen. Semen was diluted by the standard 50 million spermatozoa (sptz) per milliliter and the nanocapsules were added at a concentration of 0.1% with neutral and positive polarities. The viability of the product was tested for motility by the CASA (computer analysis system assay), membrane functionality by hyposmotic test (HOST) and membrane integrity by fluorescence test. The samples were examined at the time of collection and after 24 hours. The ANOVA test for a variable (factor), in the comparisons made; did not reveal any statistical difference ( $\alpha = 0.05$ ), and it was concluded that equine semen tolerates the presence of nanoencapsulated indomethacin in the proportion used in this study.

Keywords: nanocapsules, lipidic core, indomethacin, semen, equine.



## CIP - Catalogação na Publicação

Nunes Gonçalves Dias, Thomás  
NANOCÁPSULAS DE NÚCLEO LIPÍDICO CONTENDO  
INDOMETACINA ADICIONADAS AO DILUENTE DE SÊMEN EQUINO  
RESFRIADO / Thomás Nunes Gonçalves Dias. -- 2018.  
37 f.  
Orientadora: Adriana Pires Neves.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,  
Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Nanocápsulas. 2. Indometacina. 3. Núcleo  
Lipídico. 4. Sêmen. 5. Equino. I. Pires Neves,  
Adriana, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## LISTA DE FIGURAS

### Efeitos da adição de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo indometacina:

- Figura 1** – Na motilidade total (MT) (%) nas horas zero e 24 (1.a) e na motilidade progressiva (MP) (%) nas horas zero e 24 (1.b).....27
- Figura 2** – Na velocidade curvilinear (VCL) ( $\mu\text{m/s}$ ) nas horas zero e 24 (3.a), na velocidade progressiva (VSL) ( $\mu\text{m/s}$ ) nas horas zero e 24 (3.b) e na velocidade de trajeto (VAP) ( $\mu\text{m/s}$ ) nas horas zero e 24.....28
- Figura 3** – Na funcionalidade de membrana (CFDA/PI) (%) nas horas zero e 24.....29
- Figura 4** – Na integridade de membrana (%) nas horas zero e 24.....31

## ABREVIATURAS E SIGLAS

ART – *assisted reproduction techniques*

CASA - *computer analysis system assay*

CFDA – carboxifluoresceína

COX - ciclooxigenase

DNA – ácido desoxirribonucleico

DMSO – dimetilsulfóxido

EPPC – endometrite persistente pós cobertura

HOST - teste hiposmótico

IA – inseminação artificial

LNC - IndOH - nanocápsula de núcleo lipídico contendo Indometacina polaridade neutra

LNC<sup>+</sup> - IndOH - nanocápsula de núcleo lipídico contendo Indometacina polaridade positiva

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MET – microscopia eletrônica de transmissão

nm – nanômetro

m – metro

μm – micron

μl- microlitro

ml - mililitro

Min - minuto

Sptz – espermatozoide

PI – iodeto de propídio

TE – transferência de embrião

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1 Inseminação artificial .....	15
2.2 Endometrite persistente pós cobertura .....	16
2.3 O Sêmen .....	16
2.4. Análise seminal.....	18
2.4.1. Motilidade .....	18
2.4.2 Integridade de membrana.....	19
2.4.3 Funcionalidade de membrana.....	19
2.5 Diluentes de sêmen .....	20
2.6 Indometacina.....	21
2.7 Aspectos em nanobiotecnologia.....	22
2.8 Nanopartículas poliméricas .....	23
2.8.1 Nanocápsulas de núcleo lipídico.....	23
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>24</b>
3.1 Preparação das nanocápsulas .....	24
3.1.1 Caracterização das Nanocápsulas .....	24
3.2 Preparação das amostras .....	25
3.3 Análise estatística .....	26
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>26</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>30</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>31</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia da reprodução se mostra uma importante ferramenta a serviço da equideocultura, como instrumento direto do melhoramento genético. Dadas as vantagens proporcionadas pela inseminação artificial (IA), esta talvez seja a biotécnica com maior impacto na produção equina, pois um reprodutor pode deixar centenas de descendentes ao longo de carreira reprodutiva quando esta é aplicada com eficiência (CANISSO, et al. 2008), além de ser base de outras biotecnologias, como transferência de embriões e até mesmo a clonagem (AURICH, 2012). É utilizada em equinos pelo mundo, sendo a maneira mais comumente usada nesta espécie é mediante o resfriamento e transporte de sêmen (LOOMIS, 2006).

Não é possível preservar o sêmen por mais de algumas horas sem o uso de um diluente de sêmen, sendo o período médio em que a fertilidade do sêmen diluído se mantém é de 24 a 48 horas, posteriormente as taxas de fertilização diminuem abruptamente (AURICH, 2008). Os diluentes de sêmen são soluções destinadas a proteger os espermatozoides de condições ambientais desfavoráveis e a prolongar a sua sobrevivência (PICKETT e AMANN, 1987; BRINSKO e VARNER, 1992).

No momento da IA ou monta natural ocorre de um processo inflamatório transitório é fisiológico pós cobertura e tem como objetivo remover o excesso de espermatozoides, plasma seminal e contaminantes do útero das éguas, tornando-o adequado para o recebimento do embrião no quinto dia após a ovulação (LE BLANC et al., 1998; ZENT et al., 1998). Porém se o processo persistir, o ambiente uterino se torna incompatível com o estabelecimento da gestação (WATSON, 2000). Éguas que falham nos mecanismos de limpeza da resposta inflamatória uterina após a cobertura desenvolvem endometrite persistente pós cobertura (EPPC) que resulta em problemas de fertilidade (LE BLANC et al., 1998, ZENT et al., 1998).

A hipótese que originou este projeto foi a de que a adição de um fármaco anti-inflamatório nanoencapsulado ao diluente de sêmen poderia ser útil em modular a inflamação causada pela presença do sêmen no endométrio em éguas susceptíveis o que facilitaria o manejo ao eliminar a necessidade do tratamento após a IA.

O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos adição de uma nanocápsula de núcleo lipídico contendo indometacina em um diluente de sêmen à

base de leite desnatado, sobre motilidade, integridade e funcionalidade de membrana espermáticos.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Inseminação artificial

A inseminação artificial (IA) em equinos é largamente utilizada no mundo e a metodologia mais praticada é o uso do resfriamento e transporte de sêmen. O Brasil é o segundo país em inseminações com sêmen resfriado e transportado, superado apenas pelos Estados Unidos (LOOMIS, 2006).

Historicamente acredita-se que os Árabes sejam os primeiros a realizarem uma inseminação artificial em equinos, em 1332, mas o primeiro estudo registrado nesta técnica foi feito por Spalanzani, em 1779 (BOWEN, 1969).

A inseminação artificial oferece inúmeras vantagens sobre a monta natural, como a utilização de um ejaculado para várias doses de inseminação, a disponibilização de material genético para um número maior de criadores, a diminuição dos acidentes decorrentes da cobertura e da transmissão de algumas doenças venéreas. Entretanto, o sucesso destes programas exige maior conhecimento técnico, tanto na coleta e manipulação do sêmen, quanto no controle das matrizes ou também quanto as despesas relativas a equipamentos e suprimentos necessários (BRINSKO et. al., 2011).

O sêmen equino resfriado, mantido a +4°C por 24h, submetido a inseminação artificial apresentou índices similares aos obtidos na IA com sêmen fresco (MATTOS et al. 1995; KELLER et al. 2001).

Na inseminação artificial o sêmen é depositado no interior do útero da égua, porém apenas um pequeno percentual dos espermatozoides é transportado até o oviduto (KATILA, 1997). Para a remoção do excesso de espermatozoides, bactérias e plasma seminal ambiente uterino ocorre uma resposta inflamatória (KOTILAINEN et al., 1994; TROEDSSON et al., 1995) que é considerada fisiológica e transitória, tendo resolução entre 24 e 72 horas (PETERSON et al, 1969), as éguas capazes de eliminar este conteúdo são consideradas resistentes, no entanto, algumas falham nesta eliminação, sendo denominadas susceptíveis. A endometrite persistente pós cobertura (EPPC) é um dos fatores relacionados a égua que mais afetam negativamente os índices gestacionais em um programa de inseminação artificial. Embora a endometrite pós cobertura seja um processo considerado normal após a chegada do sêmen no útero, a EPPC ameaça o sucesso da fertilização (WOODWARD e TROEDSSON, 2013).

## 2.2 Endometrite persistente pós cobertura

Quando o sêmen é depositado no interior do útero da égua, apenas um pequeno percentual dos espermatozoides é transportado até o oviduto (KATILA, 1997). Posteriormente a cobertura ou IA, ocorre um processo inflamatório transitório no útero, uma resposta inflamatória à presença do sêmen e bactérias o que torna ambiente uterino inóspito ao conceito (KOTILAINEN et al., 1994; TROEDSSON et al., 1995). Esta endometrite é considerada fisiológica e visa a remoção do excesso de espermatozoides, contaminantes e plasma seminal, previamente a chegada do embrião ao útero e é transitória (PETERSON et al, 1969; TROEDSSON, 1997).

A capacidade ou não de combater o processo inflamatório resulta na divisão das fêmeas em resistentes ou susceptíveis a EPPC. Considera-se que as éguas que removem os contaminantes do útero diminuindo a inflamação pós-cobertura em 24 a 48 horas são consideradas resistentes, já as éguas susceptíveis são incapazes de remover completamente os contaminantes do útero e por isso, têm altas taxas de mortalidade embrionária e baixos índices de prenhez (MATTOS et al., 1999; (PYCOCK, 2009).

A utilização de drogas ecbólicas e lavados uterinos são os tratamentos mais comumente utilizados em éguas que apresentam acúmulo de líquido pós IA ou cobertura. Mais recentemente corticosteroides sistêmicos foram introduzidos com eficácia na minimização da resposta inflamatória uterina e aumentaram as taxas de gestação em éguas com EPPC (BUCCA et al., 2008; DELL'AQUA et al., 2006).

## 2.3 O Sêmen

O espermatozoide é o produto final do processo da espermatogênese após sucessivas divisões mitóticas, meióticas e pós meióticas, dentro dos túbulos seminíferos no testículo, resultando numa célula altamente diferenciada em função e estrutura, que é capaz de fertilizar o oócito da fêmea (FAWCETT, 1975).

As duas porções principais do espermatozoide são a cabeça e o flagelo, que são unidos pelo colo. O flagelo ou cauda, é subdividido em peça intermediária, principal e terminal sendo todas envoltas por uma membrana plasmática comum. A cabeça tem forma oval e achatada e abriga o núcleo com a cromatina altamente condensada, o acrossoma que possui enzimas hidrolíticas que tem função no



processo de fecundação e oferece proteção ao DNA contra choques mecânicos (HAFEZ, 1995). Esta estrutura envolve dois terços do núcleo e nela encontram-se cinco membranas: plasmática, acrossomais interna e externa e nucleares interna e externa. A membrana plasmática e acrossomais são relacionadas a capacidade espermática de suportar mudanças na bicamada lipídica relativas a diminuição da temperatura (AMANN, 1991). A função principal da cabeça do espermatozoide é assegurar o armazenamento e a liberação do material genético ao oócito, enquanto a cauda é responsável por promover a motilidade espermática para o trânsito pelo trato reprodutivo e a penetração na zona pelúcida do oócito (MORTIMER, 1997).

O colo ou peça intermediária forma uma placa ajustada dentro de uma depressão na superfície do núcleo (EDDY e O'BRIEN, 1994) e se continua por nove feixes de fibras que posteriormente se projetam através da maior parte do flagelo. A peça intermediária juntamente com a extensão total da cauda formam o axonema, (HAFEZ 1995). Com a função de gerar a energia necessária à motilidade espermática, cerca de 75 a 100 mitocôndrias estão dispostas helicoidalmente na peça intermediária, essas estruturas estão envoltas pela bainha mitocondrial (EDDY E O'BRIEN, 1994; VARNER et al., 1991). O axonema é uma estrutura composta por duas proteínas principais, a dineína e a tubulina (ALBERTS, 2004) e está envolvido no processo de motilidade espermática. A membrana plasmática engloba a célula, envolve todas as estruturas espermáticas, define seus limites e mantém as diferenças entre o citosol e o ambiente celular (AMANN e GRAHAM, 1992; ALBERTS et al., 2004). Esta é composta por uma bicamada lipídica e proteica, unidas por ligações não covalentes, em sua maioria. As moléculas lipídicas são anfipáticas, ou seja, possuem uma extremidade lipídica (polar) e uma hidrofóbica (apolar).

Durante o trajeto do espermatozoide pelo epidídimo sua superfície é remodelada mediante a incorporação de proteínas e lipídios por mecanismos ainda não bem compreendidos (SULLIVAN et al., 2005). Alguns estudos demonstram que a glicerilfosforilcolina, produzida no epidídimo parece ser chave na maturação dos espermatozoides (MANN, 1964).

Após a ejaculação os espermatozoides passam por modificações estruturais e metabólicas até adquirirem a habilidade de penetrar a zona pelúcida e fertilizar o oócito, este processo é reconhecido por capacitação (VARNER e JOHNSON, 2011).

A porção fluída do ejaculado, denominada plasma seminal, se constitui por uma mistura de secreções provenientes do testículo, epidídimo e glândulas acessórias

(TROEDSSON et al., 2005) São vários os componentes do plasma, tanto orgânicos como inorgânicos, dentre eles: aminoácidos, proteínas, íons ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ , dentre outros, frutose, bicarbonato, sorbitol, inositol, ergotiomina, glicerilfosforilcolina, ácidos cítrico, ascórbico, lipídeos, enzimas, antimicrobianos, imunoglobulinas e substâncias hormonais), todos estes em concentrações variadas (GARNER e HAFEZ; 2004). O plasma seminal atua como meio para os espermatozoides atingirem o trato reprodutivo feminino e seus componentes tem relação com a função e a fertilidade espermática, podendo tanto ter ação benéfica quanto deletéria ao espermatozoide (JASKO et al., 1992; BERGERON e MANJUNATH, 2006).

No trato reprodutivo feminino, o plasma atua no transporte e na eliminação do volume excedente de espermatozoides. Substâncias moduladoras da endometrite pós cobertura no plasma seminal, auxiliam na limpeza uterina; algumas proteínas fazem a proteção dos espermatozoides viáveis e outras auxiliam na fagocitose dos espermatozoides danificados (TROEDSSON et al., 2005).

## **2.4. Análise seminal**

### **2.4.1. Motilidade**

A avaliação da mobilidade do ejaculado é um dos testes mais importantes realizados na rotina. Os resultados são subjetivos e é necessária uma boa experiência do examinador para realizar uma avaliação confiável. No entanto, a porcentagem de espermatozoides móveis, avaliada visualmente, não está altamente correlacionada com a fertilidade (GRAHAM, 1996). A análise espermática assistida por computador (CASA) foi introduzida na década de 1970 (JASKO et al., 1988) e, desde então, é usada regularmente no processo de avaliação do sêmen em laboratórios. Esta técnica é objetiva e avalia a motilidade de acordo com os critérios estabelecidos. Os parâmetros mais importantes medidos são velocidade, linearidade, porcentagem de espermatozoides móveis acima de uma certa velocidade, movimento oscilatório lateral. Avalia-se a motilidade total (MT - %) em porcentagem, referindo-se ao percentual de células a uma velocidade mínima estabelecida; motilidade progressiva (MP - %), que é a proporção de células movendo-se progressivamente; Velocidade de trajeto (VAP -  $\mu\text{m/s}$ ) que corresponde a velocidade média ininterrupta do trajeto da célula; velocidade progressiva (VSL -  $\mu\text{m/s}$ ) que é a velocidade média percorrida em

linha reta entre os pontos inicial e final do trajeto; velocidade curvilinear (VCL -  $\mu\text{m/s}$ ), entre outras avaliações .

As relações entre fertilidade e diferentes parâmetros de motilidade de espermatozoides analisados por CASA precisam ser determinadas (MAGISTRINI et al., 1996). Entretanto, uma avaliação objetiva e imparcial de avaliação da motilidade espermática parece ser mais precisa que um exame subjetivo (ARRUDA et al., 2011).

#### **2.4.2 Integridade de membrana**

A integridade de membrana é essencial para a sobrevivência da célula espermática no trato reprodutivo da fêmea. Diversos testes de coloração foram desenvolvidos para determinar a integridade de membrana pela utilização de sondas fluorescentes que penetram a membrana espermática lesada pela afinidade com o núcleo da célula (GRAHAM, 1996; MAGISTRINI et al., 1997). Dentre a diversidade de combinação de sondas para avaliação da integridade de membrana está a combinação de carboxifluoresceína (CFDA) com iodeto de propídio (PI) (GARNER et al 1986; HARRISON e VICKERS, 1990). O PI é um corante específico de DNA, que penetra as células mortas ou “moribundas”. O CFDA é um substrato de esterase inespecífico, que penetra a membrana intacta, onde sofre hidrólise resultando em uma coloração verde altamente impermeável a membrana (GARNER et al., 1986).

#### **2.4.3 Funcionalidade de membrana**

O hiposmótico (HOST) é um teste relativamente simples para avaliar a integridade funcional da membrana espermática. É necessária uma membrana espermática bioquimicamente ativa para o processo de capacitação, reação acrossomal e a ligação do espermatozoide-oócito. Foi observado que os espermatozoides expostos a condições hiposmóticas sofrem alterações morfológicas e seu tamanho aumenta (DREVIUS e ERIKSSON, 1996). Durante o HOST, os espermatozoides bioquimicamente ativos, devido ao influxo de água, sofrerão edema e aumentarão de volume para tentar um equilíbrio entre o compartimento fluido interno dos espermatozoides e o ambiente extracelular, forçando assim o flagelo a enrolar-se no interior da membrana (JEYENDRAN et al., 1984). Os meios hiposmóticos contêm principalmente frutose e citrato de sódio misturados em proporções iguais

(JEYENDRAN et al., 1984; KUMI-DIAKA, 1993; CORREA e ZAVOS 1994; CORREA et al., 1997; VAZQUEZ et al., 1997), ou frutose, citrato de sódio, lactose e sacarose isoladas (NEILD et al., 1999). Resultados ótimos podem ser obtidos no intervalo de 50 a 150 mOsm / L de osmolaridade (JEYENDRAN et al., 1984). Os resultados do HOST dão boa correlação com a motilidade progressiva (JEYENDRAN et al., 1984; KUMI-DIAKA 1993; CORREA e ZAVOS 1994; NEILD et al., 1999).

## **2.5 Diluentes de sêmen**

Não é possível preservar o sêmen por mais de algumas horas sem a utilização de um diluente apropriado (AURICH, 2008). Os diluentes têm por função prolongar a vida espermática e a capacidade fertilizante, através da proteção contra condições ambientais desfavoráveis, efeitos prejudiciais do plasma seminal e de produtos tóxicos decorrentes do metabolismo espermático, além da prevenção do crescimento de micro-organismos (PICKETT e AMANN, 1987; BRINSKO e VARNER, 1992).

Os diluentes devem possuir pH e pressão osmótica similares aos do sêmen, como a osmolaridade do fluido seminal é próxima a 300 mOsmol/kg (PICKETT et al, 1976) o diluente deve ter osmolaridade variando entre 300 e 400 mOsmol/kg (VARNER, 1991). A variação do pH deve estar entre 6,7 e 7,2 sem que haja interferência na viabilidade espermática durante o armazenamento (BRINSKO E VARNER, 1992). Na maioria dos estudos com diluentes foram comparadas suas capacidades de aumentar a sobrevivência dos espermatozoides, sendo os animais uma fonte de variação significativa, não somente em garanhões, portanto nenhum diluente parece ser ótimo a todos os indivíduos (PICKETT e AMANN, 1987).

Embora existam vários tipos de diluente de resfriamento, o mais utilizado é o modelo proposto por Kenney (1975) a base de leite desnatado, glicose, penicilina e estreptomicina. Diversas modificações deste modelo estão disponíveis comercialmente, como alterações no teor do açúcar ou o tipo de antibiótico adicionado, dois tipos principais de açúcar são utilizados, a sacarose ou a glicose, ou mesmo uma combinação dos dois. Alternativamente a utilização do leite, foi desenvolvido um diluente composto por uma solução salina enriquecida com fosfocaseinato de composição química definida, o INRA-96R® (BATELLIER, et al., 1998). Outros tipos de diluentes são complementados com gema de ovo, ou mesmo sem adição de proteína animal. Todos os diluentes devem conter um antibiótico. Os

mais comuns incluem uma combinação de penicilina potássica e sulfato de amicacina ou gentamicina (SAMPER, 2011).

## 2.6 Indometacina

A indometacina é um anti-inflamatório não esteroide, derivado do ácido indolacético, apresentando-se como um pó cristalino, inodoro, de coloração branco amarelada (REYNOLDS, 1993). De potente ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética a indometacina foi introduzida terapêuticamente no tratamento de doenças inflamatórias reumáticas (WANNMACHER e FERREIRA, 2004). Sua atividade anti-inflamatória é mediada tanto pela inibição das COX 1 e 2 quanto pela inibição da migração neutrofílica (JACOBS e BIJLSMA, 1997; PESKAR, 2001)

Em função dos seus efeitos adversos dose dependentes, tais como ulcerações gástricas e insuficiência renal, seu uso é restrito a doenças inflamatórias graves, onde outras alternativas terapêuticas não são efetivas. Buscando reduzir estes efeitos, foram propostas a esterificação ou amidação do grupamento ácido (BONINA et al., 1997; KALGUTKAR et al., 2000; CRUZ et al. 2006) introdução em sistemas carreadores, tais como lipossomas (SRINATH et al., 2000), microesferas lipídicas (SRINATH e DIWAN, 1998) ou nanopartículas (AMOUMOURY et al., 1991; CALVO et al. 1996; KIM et al., 2001; POHLMANN et al., 2002).

Em humanos os efeitos uterinos da indometacina foram avaliados no tratamento da dismenorreia primária. Em comparação com o placebo, a indometacina levou a uma diminuição significativa na frequência e gravidade dos sintomas associados (AL-WAILI e KHALAF, 1990). No entanto não foram encontrados estudos dos efeitos uterinos da indometacina na espécie equina.

Em trabalho avaliando efeitos antitumoral, neuroprotetor e anti-inflamatório das nanocápsulas de indometacina, o tratamento "nano" demonstrou maior eficácia anti-inflamatória quando comparado ao com indometacina em solução em modelos de inflamação subcrônica e crônica. Além disso, a vetorização da indometacina foi capaz de prevenir a toxicidade gastrointestinal observada pelo tratamento com indometacina em solução (BERNARDI, 2009).

## 2.7 Aspectos em nanobiotecnologia

O prefixo “nano” é derivado da palavra grega νᾶνος (nános) que significa “anão”. É um termo técnico que significa um bilionésimo da unidade de medida em questão. Por exemplo, um nanômetro equivale a um bilionésimo de um metro:  $1\text{nm} = 1/1.000.000.000\text{m}$ . O domínio da nanotecnologia está compreendido entre 0,1 e 100nm, onde as propriedades dos materiais podem ser compreendidas e mensuradas. O termo começou a ser utilizado em 1974, por Norio Taniguchi, professor da universidade de Tóquio. A nanotecnologia oferece um novo campo para fabricação de materiais em escala submicrométrica até se chegar a nanodispositivos (MEDEIROS, et al., 2006).

A nanobiotecnologia pode ser definida como o estudo, processamento, fabricação e desenho de dispositivos orgânicos, nanomateriais com ação biológica ou biomateriais com pelo menos um componente de tamanho nanométrico (BERNARDI, 2009).

Nas últimas décadas, o emprego da nanotecnologia na terapêutica vem despertando interesse crescente da comunidade científica devido às vantagens dos sistemas carreadores nanoparticulados em relação aos sistemas carreadores convencionais, tais como o aumento do tempo de circulação do fármaco no sangue e a de controle de liberação do fármaco, seletividade em sítios-alvo específicos, bem como diminuição da dose e efeitos colaterais. (TORCHILIN, 2000; BARRATT, 2003; COUVREUR & VAUHTIER, 2006).

Na área da Medicina Veterinária, sua aplicação é ainda incipiente, porém, para a FAO (2009) a nanotecnologia pode ampliar a capacidade de produção de alimentos de origem animal. Dentre os seus segmentos, a nanofarmacologia talvez seja a área que tenha dado o maior salto tecnológico nos últimos tempos, e, dada a similaridade, muitas das tecnologias desenvolvidas para humanos podem ser transpostas para animais (MELLO BRANDÃO et al., 2011).

O uso de fármacos “inteligentes” nas práticas veterinárias é uma forte tendência (SCOTT, 2007). O procedimento de nanoestruturação de um fármaco pode lhe dar algumas vantagens em relação ao tradicional. Além disso, no interior de uma nanopartícula, a estabilidade do princípio ativo tende a ser maior (MELLO BRANDÃO et al., 2011).

As consequências práticas da nanoestruturação de fármacos seriam: uso mais racional do princípio ativo; uso de novas vias de aplicação de medicamentos e vacinas; liberação sustentada e direcionamento do princípio ativo a órgãos-alvo (MELLO BRANDÃO et al., 2011).

Dentre os diversos sistemas de nanocarreadores de fármacos descritos em literatura, destacam-se neste estudo as nanocápsulas poliméricas.

## **2.8 Nanopartículas poliméricas**

Nanopartículas poliméricas são carreadores de fármacos com diâmetros inferiores a 1 $\mu$ m. As nanocápsulas constituem-se de um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, o fármaco em si pode estar dissolvido neste núcleo ou apresentar-se adsorvido a parede do polímero, a depender das propriedades físico-químicas e da composição dos sistemas.

O uso de materiais poliméricos na encapsulação de fármacos, dentre outras características, proporciona uma melhor interação do fármaco com membranas, transporte através delas (COUVREUR e VAUHTIER, 2006). Ainda, as nanopartículas poliméricas permitem modificações químicas em sua superfície, permitindo um controle farmacocinético na vetorização do agente terapêutico propriamente dito (FARAJI e WIPF, 2009).

Recentemente, as nanocápsulas de núcleo lipídico, um tipo híbrido de nanopartícula, foram desenvolvidas no Brasil, sendo preparadas por deslocamento de solvente e formadas por auto-organização de seus materiais, lipídicos e poliméricos (DIMER et al., 2013).

### **2.8.1 Nanocápsulas de núcleo lipídico**

As nanocápsulas de núcleo lipídico tem sido preparadas por deposição interfacial de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) usando uma dispersão de materiais lipofílicos como núcleo, ou seja, um lipídio disperso envolto por uma parede polimérica, composta por monoesterato de sorbitano e triglicerídeo caprílico (JORNADA, et al., 2012; DURLI, et al, 2013).

As aplicações da LNC variam desde o fornecimento de fármaco, imunoterapia contra câncer e terapia genética (POHLMANN et al., 2013), além da grande capacidade de captação de células dessas nanocápsulas (FIEL et al., 2014). Na terapia genética, foram utilizados polímeros catiônicos para modificar a superfície das nanocápsulas (BENDER, et al., 2012)

As nanocápsulas de núcleo lipídico possuem uma dispersão de lipídeos como núcleo e uma parede polimérica como invólucro, enquanto que as nanocápsulas poliméricas possuem um lipídeo líquido como óleo e o polímero como parede (COUVREUR et al, 2002).

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Preparação das nanocápsulas**

A preparação das nanocápsulas foi realizada no Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para Administração de Fármacos da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

As suspensões de nanocápsulas de núcleo lipídico foram preparadas pelo método de deposição interfacial de polímero. A 40°C uma fase orgânica contendo triglicerídeos dos ácidos cáprico/caprílico (0,32 ml), monoesterato de sorbitano (0,1g), poli-ε caprolactona (polímero) (0,25g) e o fármaco (0,0125g), eram dissolvidos em acetona (65 ml) e injetados numa fase aquosa contendo polissorbatto 80 (0,2g) e água destilada (125 ml). A mistura foi agitada em temperatura ambiente por 10 minutos, a acetona eliminada e a suspensão concentrada em um evaporador rotatório.

##### **3.1.1 Caracterização das Nanocápsulas**

O pH foi determinado por potenciômetro e o diâmetro de partícula através de difração de laser (Mastersizer® 2000, Malvern), calibrado (soluções-tampão pH 4,0 e 7,0) em triplicatas de lotes diferentes de cada formulação. As determinações de diâmetro médio, potencial zeta e índice de polidispersão das formulação foram realizadas através de espelhamento de luz dinâmico (Zetasizer®, nano-ZS modelo ZEN 3600, Malvern, após diluição apropriada das dispersões em água (MilliQ®) e NaCl 10 mM previamente filtrada através de membrana 0,45 µm. A distribuição de



tamanhos em função da intensidade de luz espalhada foram caracterizados através do equipamento Nanosight® (Nanosight, UK), este nanoscópio filma a intensidade de luz espalhada pelas nanopartículas em movimento Browniano, calcula o coeficiente de difusão de 100 a 200 partículas por campo. As formulações foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (Jeol, JEM 1200 ExII, Centro de Microscopia da UFRGS). As dispersões foram diluídas e depositadas no *grid* de amostras e tratadas com acetato de uranila à 2%.

As preparações continham concentração em média de 0,5mg/ml de Indometacina e com pH próximo a 6,0, todas as mensurações foram feitas em triplicata para melhor acurácia e ficaram a cargo da equipe do Laboratório de Sistemas Nanoestruturados para a administração de Fármacos (Lab 405) da Faculdade de Farmácia.

### 3.2 Preparação das amostras

Utilizaram-se três garanhões entre seis e nove anos, mantidos em piquetes e alimentados com aveia em grão e alfafa, com acesso a água e sal mineral *ad libitum*. Foram coletados 12 ejaculados ao total através de vagina artificial modelo *Hannover* com temperatura interna em torno de 42 a 45°C preenchida com água morna; como manequim era utilizada uma fêmea em cio devidamente contida. Logo após, a fração espermática era separada da fração gel do ejaculado e então calculada a concentração para ajuste da diluição em 50 milhões de espermatozoides (sptz) por mililitro (ml) e adicionado o tratamento na proporção de 0,1% (10ml de sêmen diluído:100 $\mu$ l de IndoH). As amostras eram armazenadas em tubos do tipo "falcon de 15 ml. Os grupos foram testados foram: Sêmen diluído acrescido de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo Indometacina com polaridade neutra (LNC - IndOH), sêmen diluído acrescido de nanocápsulas de núcleo lipídico contendo Indometacina com polaridade positiva (LNC<sup>+</sup>-IndOH), e sêmen diluído (grupo controle).

A avaliação do movimento espermático era feita através do sistema de análise computadorizada de motilidade espermática por imagem CASA (modelo Androvision® Minitube, Tiefenbach, Germany), onde foram avaliados motilidade total (MT, %) motilidade progressiva (MP, %), velocidade de trajeto (VAP,  $\mu$ m/s), velocidade retilínea (VSL,  $\mu$ m/s), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), três campos por amostras eram avaliados.

A funcionalidade de membrana via HOST, onde 100 µl de sêmen eram diluídos em 200µl de água destilada (LOMEO e GIAMBERSIO, 1991; LAGARES et al.; 2000) e então encubados em banho maria a 37°C por 8 min e 100 células eram avaliadas utilizando microscópio de contraste de fase a 400x de aumento (Olympus® BX41, Olympus Corporation, Tokyo, Japan).

A integralidade de membrana foi avaliada através da associação das sondas CFDA+PI, uma alíquota de 450 µl de sêmen adicionada com 20 µl de formol-citrato e 8µl de iodeto de propídio (solução de trabalho 0,5 mg de PI em 1ml de solução de NaCl a 0,9 %) e 10µl de CFDA (solução de trabalho, 0,46mg de CFDA em 1 ml de DMSO) e encubados em banho maria a 37°C por 8 min. As amostras eram analisadas usando microscopia de fluorescência (1000x; Zeiss® model Axiolab filters 450-490 excitation and FT510 - LP520 emission, Zeiss, Oberkochen, Germany) e um total de 100 células era contado. Células com coloração verde eram consideradas com membrana plasmática íntegra, células com coloração vermelha consideradas lesadas.

Os tubos foram armazenados em geladeira mantida a 5°C, sendo que as amostras eram reexaminadas após 24 horas.

### **3.3 Análise estatística**

Foi usado o teste de variância para um fator (ANOVA), com base nos dados compilados durante a pesquisa.

## **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A média da concentração espermática dos ejaculados foi de  $190 \times 10^6$  sptz/ml  $\pm$  51,31, o volume ejaculado médio foi 26,16 ml  $\pm$  9,34, o número de espermatozoides por ejaculado médio foi  $5,03 \times 10^9$  sptz  $\pm$  2,61.

O diluente a base de leite em pó parece ser o mais adequado para a preservação do sêmen equino durante o armazenamento e resfriamento. Quando não é utilizado de forma imediata, ou para ser transportado, recomenda-se concentrações de 25 a  $100 \cdot 10^6$  sptz/ml (KATILA, 1997), o que justifica a escolha deste estudo, utilizando um diluente comercial a base de leite em pó amplamente utilizado e

concentrando o sêmen a  $50.10^6$  spz/ml, entretanto MORTIMER (1995) recomendou utilizar concentrações menores que  $40.10^6$  spz/ml para que as trajetórias dos espermatozoides fossem melhores registradas.

Em nenhuma das análises feitas no presente experimento foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos avaliados: sêmen diluído (Controle), sêmen diluído adicionado de LNC-IndoH<sup>+</sup> (Positivo), sêmen diluído LNC-IndoH (Neutro), nos parâmetros avaliados (MT, MP, VCL, VSL, VAP, HOST, CFDA-PI), tanto nos testes realizados imediatamente quanto pós 24 horas ( $P > 0,05$ ):

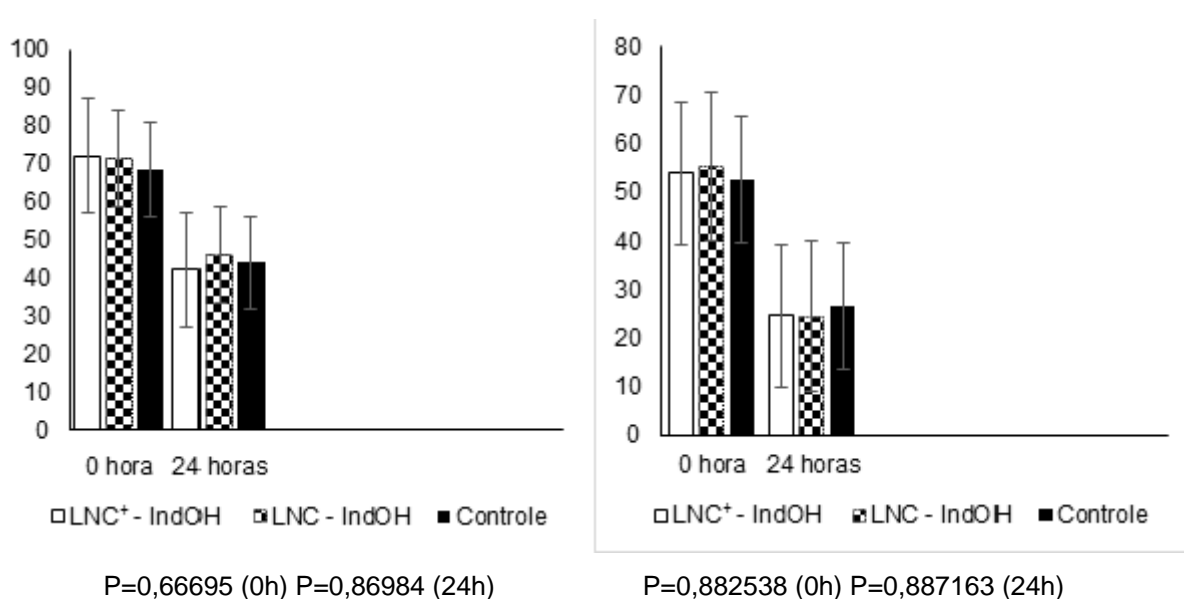
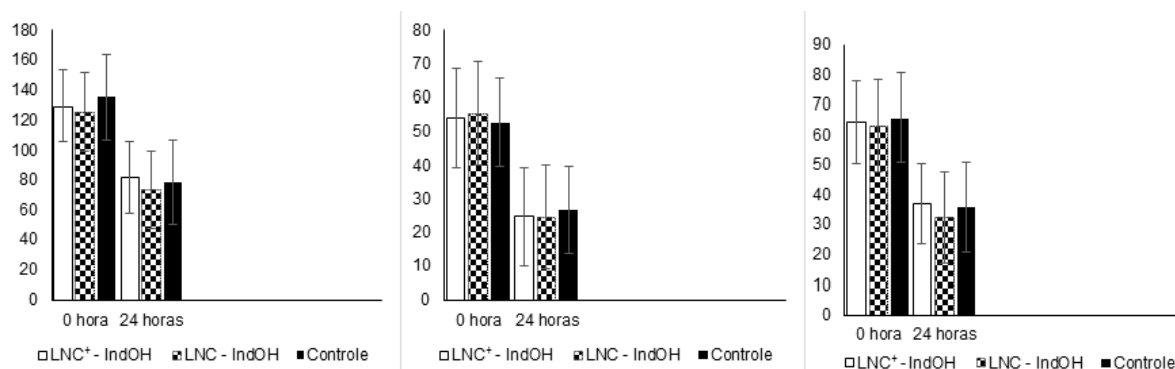


Figura 1 – Motilidade total (%) (1.a) e Motilidade progressiva (%) (1.b) nas horas zero e 24.

A MT média entre os grupos foi de 70,59% ( $\pm 1,86$ ) na hora zero e de 44,13 ( $\pm 1,92$ ) pós 24 horas (figura 1), resultados estes que se aproximam aos do trabalho realizado por CASTRO (2014) utilizando mesma temperatura de resfriamento e diluente similar, onde a MT pós 24 h encontrada foi 47,3%.

A MP média entre os grupos foi de 53,93% ( $\pm 1,25$ ) na hora zero e 25,24% ( $\pm 1,22$ ) pós 24 horas (figura 2).



P=0,657381 (0h) P=0,741615 (24h) P=0,951697 (0h) P=0,563002601 (24h) P=0,944418 (0h) P=0,71354 (24h)

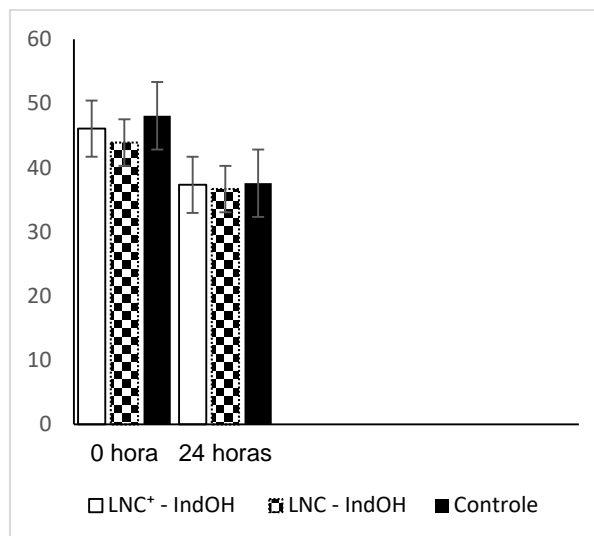
Figura 3 - Velocidade curvilínea(μm/s) (3.a), velocidade progressiva (μm/s) (3.b) e velocidade de trajeto (μm/s) (3.c) nas horas zero e 24

A VCL média entre os grupos foi de 129,88 μm/s ( $\pm$  5,13) na hora zero e 77,61 μm/s ( $\pm$  4,33) pós 24 horas (figura 3.a).

A VSL média entre os grupos foi de 52,85 μm/s ( $\pm$  0,99) na hora zero e 77,61 μm/s ( $\pm$  4,33) pós 24 horas (figura 3.b).

A VAP média entre os grupos foi de 64,30 μm/s ( $\pm$  1,24) na hora zero e 35,07 μm/s ( $\pm$  2,33) pós 24 horas (figura 3.c).

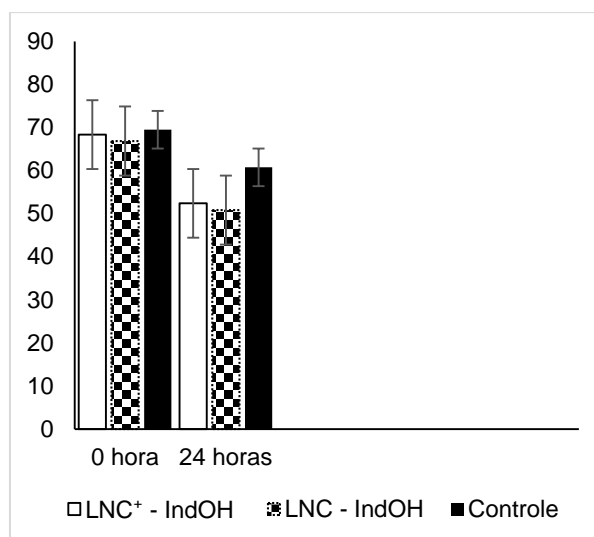
SILVA et al. (2017) também analisaram os efeitos de nanocápsulas de núcleo lipídico (LNC) em espermatozoides bovinos, comparando-as com nanocápsulas de núcleo lipídico revestidas por quitosana (LNC-CS) e em diferentes concentrações, avaliando horas zero e pós uma hora, onde os grupos com volumes variando entre 2,5 a 20% se comportaram similarmente ao grupo controle, corroborando com os resultados já descritos em literatura, que demonstram que não há toxicidade nas LNC, ou nas LNC-CS (BENDER et al., 2014; BULCÃO et al., LUCAS et al., 2015) o que indica que as nanocápsulas de núcleo lipídico devem ser mais profundamente estudadas nas técnicas de reprodução assistidas (ART's), sobretudo com células espermáticas.



0h, P=0,780589 24h, P=0,987281

Figura 3 – Funcionalidade de membrana (%) nas horas zero e 24.

A HOST média entre os grupos foi de 46,02% ( $\pm 2,08$ ) e 37,19% ( $\pm 0,47$ ) pós 24 horas (figura 6), também semelhante aos resultados de CASTRO (2014) onde nas 24 horas encontrou-se HOST= 33,3%.



P=0,819226 (0h) P=0,191179 (24h)

Figura 4 – Integridade de membrana (%) nas horas zero e 24

A CFDA/PI média entre os grupos foi de 68,24% ( $\pm 1,31$ ) e 54,67% ( $\pm 5,33$ ) (figura 6), aproximando-se aos resultados de CASTRO (2014) onde nas 24 horas encontrou-se CFDA/PI= 52,7%.

## **5 CONCLUSÃO**

Demonstrou-se neste estudo que as nanocápsulas de núcleo lipídico contendo indometacina são bem toleradas pelo sêmen diluído resfriado de equinos, na proporção utilizada.

## **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os próximos passos desse projeto devem envolver testes de fertilidade e os efeitos das nanocápsulas no ambiente uterino.

A viabilidade da adição das nanocápsulas ao sêmen equino resfriado abre um promissor espaço de pesquisa para outros fármacos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B; JOHNSON, A. LEWIS J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Organização interna da Célula: Estrutura da Membrana. Em: **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. Cap. 10 p. 583-595.

AL-WAILI NS, KHALAF ZD. Efficacy of indomethacin suppository in primary dysmenorrhoea. **Indian Journal of Medical Research**, v. 92, p. 298-301, 1990.

AMANN, RP. Fertility of cryopreserved sperm. **Contraception Fertilite Sexualite**, v. 19, p. 946-954, 1991.

AMANN, R.P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal Function. In: McKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger. c. 80, p. 717-718. 1992.

AMANN R.P.; PICKETT B.W. Principles of cryopreservation and a review of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3. p. 145–173, 1987.

AMMOURY, N.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J-P.; DUBRASQUET, M.; BENITA, S. Jejunal absorption, pharmacological activity, and pharmacokinetic evaluation of indomethacin-loaded poly(D, L-lactide) and poly(isobutyl-cyanocrylate) nanocapsules in rats. **Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 1, p. 101-105, 1991.

ANDERSSON, M.A., MIKKOLA, R., RAULIO, M., KREDICS, L., MAIJALA, P., SALKINOJA-SALONEN, M.S. Acrebol, a novel toxic peptaibol produced by an *Acremonium exuviarum* indoor isolate. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 909–923, 2009.

ARRUDA, R. P.; CELEGUINI, E; C. C.; ALONSO, M. A.; CARVALHO, H. F.; OLIVEIRA, L. Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D; F.; AFFONSO, F. J.; LEMES. K. M.; JAIMES, J. D. Methods of assessment of morphology and function of sperm: actual moment and future challenges. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v. 35: n. 2, p. 145-151, 2011.

AURICH C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 268-75, 2008.

AURICH, J. E. Artificial Insemination in Horses - More than a Century of Practice and Research. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 458-463, 2012.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 21–37, 2003.

BATELIER, F.; DUCHAMP, G.; VIDAMENT, M.; ARNAUD, G.; PALMER, E.; MAGISTRINI, M. Delayed insemination is successful with a new extender for storing fresh equine semen at 15°C under aerobic conditions. **Theriogenology**, v. 50, p. 229- 236, 1998.

BENDER, E.A., ADORNE, M.D., COLOMÉ, L.M., ABDALLA, D.S.P., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Hemocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) lipid-core nanocapsules stabilized with polysorbate 80-lecithin and uncoated or coated with chitosan. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 426, p. 271–279, 2012.

BERGERON A, MANJUNATH P. New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. **Molecular Reproduction Development**, v. 73, p. 1338-1344, 2006.

BERNARDI, A. **Nanocápsulas contendo indometacina: avaliação dos efeitos antitumoral, neuroprotetor e anti-inflamatório**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) Faculdade de Bioquímica, Porto Alegre, UFRGS, 180 p., 2009.

BERNARDI, A., BRAGANHOL, E., JÄGER, E., FIGUEIRO, F., EDELWEISS, M.I., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S., BATTASTINI, A.M.O., Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model. **Cancer Letters**, v. 281, p. 53-63, 2009.

BONINA, F.; TROMBETA, D.; BORZI, A.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A.. 1-ethylazacycolalkan-2-one indomethacin esters as new oral pro-drugs: chemical stability, enzymatic hydrolysis, anti-inflammatory activity and gastrointestinal toxicity. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 156, p 245-250, 1997.

BOWEN JM. Artificial insemination in the horse. **Equine Veterinary Journal**, v. 1, p. 98-108, 1969.

BRINSKO, SP; VARNERR, DD. Artificial insemination and preservation of semen. In: Blanchard, TL. ; Varner, DD. Stallion management. **Veterinary Clinician North American: Equine Practice**, v. 8, n. 1, p. 205-218, 1992.

BUCCA, S.; CARLI, A.; BUCKLEY, T.; DOLCI, G.; FOGARTY, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. **Theriogenology**, v. 70, p. 1093–1100, 2008.

BULCÃO, R.P., FREITAS, F.A. DE, DALLEGRAVE, E., VENTURINI, C.G., BAIERLE, M., DURGANTE, J., SAUER, E., CASSINI, C., CERSKI, C.T., ZIELINSKY, P., SALVADOR, M., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S., GARCIA, S.C. In vivo toxicological evaluation of polymeric nanocapsules after intradermal administration. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, p. 167–177, 2014.

CALVO, P.; VILA-JATO, J.L.; ALONSO, M. J. Comparative *in vitro* evaluation of several colloidal systems, nanoparticles and nanoemulsions as ocular drugs carriers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, n. 5, p. 530-536, 1996.

CANISSO, I. F.; SOUZA, F. A.; SILVA, E. et al. Inseminação artificial em equinos: sêmen fresco, diluído, resfriado e transportado. **Revista Acadêmica Ciências Agrárias Ambientais**, v. 6, n. 3, p. 389-398, 2008.

COUVREUR, P.; GILLIAN, B.; FATTAL, E.; LEGRAND, P.; VAUTHIER, V. Nanocapsule technology: A review. In: Critical Reviews. **Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 19, n. 2, p. 99-134, 2002.



- CRUZ, L.; SOARES, L. U.; DALLA COSTA, T.; MEZZALIRA, G.; SILVEIRA, N. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Diffusion and mathematical modeling of release profiles from nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 313, p. 198-205, 2006.
- DIMER, F. A.; FRIEDRISH, R. B.; BECK, R. C. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.
- EDDY, E.M.; O'BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: Knobil, E; Neill, J. D. **The physiology of Reproduction**, 2ed. New York: Raven Press c. 1, p. 3-54, 1994.
- DELL'AQUA, J.A. JR., PAPA, F.O., LOPES, M.D., ALVARENGA, M.A., MACEDO, L.P., MELO, C.M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, n. 1-4, p. 270-273, 2006.
- DURLI, T.L., DIMER, F.A., FONTANA, M.C., POHLMANN, A.R., BECK, R.C.R., GUTERRES, S.S. Innovative Approach to Produce Submicron Drug Particles by Vibrational Atomization Spray Drying: Influence of the Type of Solvent and Surfactant 9045. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, p. 1-10, 2013.
- FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations/ World Health Organization). FAO/WHO Expert Meeting on the application of Nanotechnologies in the Food and Agriculture Sectors: Potential Food Safety Implications: **Meeting Report**. Rome, 24 p., 2009.
- FARAJI, A. H.; WIPF, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 2950-2962, 2009.
- FAWCETT, D. W. The mammalian spermatozoon. **Developmental Biology**, v. 44, n. 2, p. 394-436, 1975.
- FERREIRA, M. B. C., WANNMACHER, L. Anti-inflamatórios não esteróides. In: FUCHS, F. D., WANNMACHER, L, FERREIRA, M. B. C. **Farmacologia Clínica – Fundamentos da Terapêutica Racional**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. c. 23, p. 296-304.
- FIEL, L.A., CONTRI, R.V., BICA, J.F., FIGUEIRÓ, F., MARIA, A., BATTASTINI, O., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R., 2014. Labeling the Oily Core of Nanocapsules and Lipid-Core Nanocapsules with a Triglyceride Conjugated to a Fluorescent Dye as a Strategy to Particle Tracking in Biological Studies. **Nanoscale Research Letters**, p. 1-11, 2014.
- GARNER DL, HAFEZ ESE. Espermatózoide e plasma seminal. In: Hafez, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7. ed. Barueri: Manole Ltda, 2004. c.7, p. 97-110.
- GRAHAN, J. K. Cryopreservation of stallion spermatozoa. **Reproduction Technology**, v. 12, n. 1, p. 131-145, 1996.
- HAFEZ. E.S.E. Avaliação do sêmen. Em: Hafez, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6 ed. São Paulo: Editora Monole Ltda., p. 411-429, 1995.

- JASKO, D. J. Evaluation of stallion semen. In: Blanchard, T. L., Varner, D. D. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 8, n. 1, p. 129-148, 1992.
- JASKO, D. J., LITTLE, T. V., SMITH, K., LEIN, D. H., FOOTE, R.H. Objective analysis of stallion sperm motility. **Theriogenology**, v. 30, n. 6, p.1159-1167, 1988.
- JORNADA, D.S., FIEL, L.A., BUENO, K., GERENT, J.F., PETZHOLD, C.L., BECK, R.C.R., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R. Lipid-core nanocapsules: mechanism of self-assembly, control of size and loading capacity. **Soft Matter**, v. 8, p. 6646–6655, 2012.
- KALGUTKAR, A. S.; MARNETT, A. B.; CREWS, B. C.; REMMEL, R. P.; MARNETT, L. J. Ester and amide derivatives of the nonsteroidal anti-inflammatory drug, indomethacin, as selective cyclooxygenase-2 inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 15, p. 2860-2870, 2000.
- KATILA, T. Interactions of the uterus and semen. **Pferdeheilkunde**, v. 13, n.5, p. 508-511, 1997.
- KELLER, A. MALSCHITZKY, E. HÖTT, A. VIEIRA, MJ. GREGORY, RM. MATTOS, RC. Effect of method of seminal plasma removal, extender and length of storage on motility and fertility of equine semen. **Animal Reproduction Science**. Proceedings. 3<sup>rd</sup> ISSR. Colorado-EUA. v. 68, n.3-4, p. 318-319, 2001.
- KENNEY, R.M., BERGMAN, R.V., COOPER, W.L. et al. Minimal contamination techniques breeding mares: technique and preliminary findings. **Proceedings of the American Association of Equine Practitioners**, v.21, p.327-336, 1975.
- KIM, S.Y.; LEE, Y. M.; SHIN, H. J.; KANG, S. J. Indomethacin-loaded methoxy poly(ethylene glycol)/ poly(e-caprolactone) diblock copolymeric nanosphere: pharmacokinetic characteristics of indomethacin in the normal Sprague-Dawley rats. **Biomaterials**, v. 22, p. 2049-2056, 2001.
- KOMNINOU E.R., REMIÃO MH, LUCAS CG, DOMINGUES WB, BASSO AC, JORNADA DS, et al. Effects of Two Types of Melatonin-Loaded Nanocapsules with Distinct Supramolecular Structures: Polymeric (NC) and Lipid-Core Nanocapsules (LNC) on Bovine Embryo Culture Model. **Plos One**, v. 11, n. 6, 19 p., 2016.
- KOTILAINEN, T HUHTINEN, M. KATILA, T. Sperm-induced leucocytosis in the equine uterus. **Theriogenology**, v. 41, p. 626-636, 1994.
- JACOBS, J. W. G.; BIJLSMA, J. L J. NSAIDs: a critical appraisal. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 51, p. 198-204, 1997.
- LOOMIS, P.R. Advanced methods for handling and preparation of stallion semen. **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 22, p. 663–676, 2006.
- LUCAS, C.G., REMIÃO, M.H., KOMNINOU, E.R., DOMINGUES, W.B., HAAS, C., DE LEON, P.M.M., CAMPOS, V.F., OURIQUE, A., GUTERRES, S.S., POHLMANN, A.R., BASSO, A.C., SEIXAS, F.K., BECK, R.C.R., COLLARES, T. Tretinoin-loaded lipid-core nanocapsules decrease reactive oxygen species levels and improve bovine

embryonic development during in vitro oocyte maturation. **Reproductive Toxicology**, v. 58, p. 131–139, 2015.

MAGISTRINI, M. VIDAMENT, M. CLEMENT, F. PALMER. E. Fertility prediction in stallions. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 181-188, 1996.

MANN, T. Metabolism of Semen: fructolysis, respiration and sperm energetics. In: MANN, T. (ed.) **The biochemistry on Semen and of the Male Reproductive Tract**. New York: Barnes and Noble, 1964. p. 265-327.

MANJUNATH, P. New insights into the understanding of the mechanism of sperm protection by extender components. **Animal Reproduction**, v.9, n.4, p. 809-815, 2012.

MATTOS, R. **Influência de diferentes métodos de preservação do sêmen equino sobre a fertilidade, motilidade espermática e contaminação bacteriana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) Faculdade de Veterinária, UFRGS Porto Alegre, 144 p., 1995.

MEDEIROS, E. S.; PATERNO, L.G.; MATTOSO, L.H.C. Nanotecnologia. In: **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Duran, N.; Mattoso, L.H.C.; Moraes, P.C. Ed. Artliber, São Paulo, 2006, p. 13-29.

MELLO BRANDÃO, H.; GERN, J.C.; VICENTINI, N.M.; PEREIRA, M.M.; ANDRADE, P.V.D. Nanotecnologia: a próxima revolução na agropecuária. **Revista CFMV**, v. 17, n. 53, p. 61-67, 2011.

MIKKOLA, R., ANDERSSON, M.A., TEPLOVA, V., GRIGORIEV, P., KUEHN, T., LOSS, S., TSITKO, I., APETROAIE, C., SARIS, N.E.L., VEIJALAINEN, P., SALKINOJA-SALONEN, M.S. Amylosin from *Bacillus amyloliquefaciens*, a K<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> channel-forming toxic peptide containing a polyene structure. **Toxicon**, v. 49, p. 1158–1171, 2007.

MORTIMER, D, AITKEN R.J., MORTIMER, S.T., PACEY, A. A. Workshop report: clinical CASA—the quest for consensus. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 7, n. 4, p. 951–959, 1995.

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. 403-439, 1997.

PAGL, R.; AURICH, J.E.; MÜLLER-SCHLÖSSER, F. KANKKOFER, M.; AURICH, C. Comparison of an extender containing defined milk protein fractions with a skim milk-based extender for storage of equine semen at 5°C. **Theriogenology**, v. 6, p. 1115-1122, 2006.

PELTOLA, J., RITIENI, A., MIKKOLA, R., GRIGORIEV, P.A., PÓCSFALVI, G., ANDERSSON, M.A., SALKINOJA-SALONEN, M.S. Biological effects of *Trichoderma harzianum* peptaibols on mammalian cells. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 8, p. 4996–5004, 2004.

PESKAR, B. M. Role of cyclooxygenase isoforms in gastrical mucosal defense. **Journal of Physiology – Paris**, v. 95, p. 3-9, 2001.

PETERSON, F.B., McFEELY, R. A. DAVID, J. S. E. Studies on the pathology of endometritis in the mare. **Procedures of 15<sup>th</sup> American Association Equine Practice**. Houston, p. 279-287, 1969.

PICKETT, BW; AMANN, RP. Extension and Storage of stallion spermatozoa: a review. **In: Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 5, p. 289- 302, 1987.

POHLMANN, A. R.; WEISS, V.; MERTINS, O.; SILVEIRA, N. P. GUTERRES, S. S.; Spray-dried indomethacin-loaded polyester nanocapsules and nanospheres: development, stability evaluation and nanostructure models. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 305-312, 2002.

REMIÃO, M.H., LUCAS, C.G., DOMINGUES, W.B., SILVEIRA, T., BARTHER, N.N., KOMNINO, E.R., BASSO, A.C., JORNADA, D.S., BECK, R.C.R., POHLMANN, A.R., VARELA, A.S., SEIXAS, F.K., CAMPOS, V.F., GUTERRES, S.S., COLLARES, T.V. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive Toxicology** v. 63, p. 70-81, 2016.

REYNOLDS, J. E. F. Martindale: The Extra Pharmacopeia. **Pharmaceutical Press**, 40 Ed. Londres, 1993, p. 4688.

SAMPER, J. C. 2011. Breeding with cooled transported semen. In: MCKINNON, A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 2 Ed. Wiley-Blackwell, 2011, v. 128, p. 1316-1323.

SCOTT, N.R. Nanoscience in Veterinary Medicine. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 139-144, 2007.

SILVA, A.C.J, REMIRÃO, M. H. LUCAS, C. G.; DOINGUES, W. B.; SILVEIRA, T.; PASCHOAL, J. D.; JORNADA, D. S.; CORCINE, C. D., VARELA, A. S. J.; PRADO, W. A.; CAMPOS, V. F.; SEIXAS, F. K.; GUTERRES. S. S. POHLMANN, A. R.; COLLARES, T. Effect of chitosan-coated lipid-core nanocapsules on bovine sperm cells. **Toxicology in vitro**, v. 40, p. 2014-222, 2017.

SIQUEIRA, N.M., CONTRI, R.V., PAESE, K., BECK, R.C.R., POHLMANN, A.R., GUTERRES, S.S. Innovative sunscreen formulation based on benzophenone-3-loaded chitosan-coated polymeric nanocapsules. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, p. 166–174, 2012.

SIRINATH, P.; DIWAN, P. V. Pharmacodynamic and pharmacokinetic evaluation of lipidic microspheres on indomethacin. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 73, p. 199-203, 1998.

SIRINATH, P.; VYAS, S. P. DIWAN, P. V. Preparation and Pharmacodynamic Evaluation of Liposomes of Indomethacin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 26, n. 3, p. 313-321, 2000.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F.; GIROUARD, J.; FRENETTE, G.; Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. **Blood Cells, Molecules and Diseases**, v. 35, p. 1-10, 2005.

TORCHILIN, V.P. Drug targeting. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, p. 81–91, 2001.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461-71, 1999.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine response to semen deposition in the mare. **Proc. For Ann. Meet Of Soc. For Teriog**. San Antonio, p. 130-135, 1995.

VARNER, DD; JOHNSON, L. From a Sperm's Eye View: Revisiting Our Perception of this Intriguing Cell. In: Mackinnon, AO. **Equine Reproduction** 2<sup>nd</sup> Ed. p 910-990, 2011.

VARNER, D.D.; SCHUMACHER, J. BLANHCARD, T.L.; JOHNSON, L. Breeding soundness examination. In: Varner, DD; Schumacher, J. Blanhcard, T.L.; Johnson, L. **Diseases and management of the breeding stallions**. Goleta-California: Am. Vet. Public., 1991, p. 97-116.

WATSON, E.D. Post-breeding endometritis in the mare. **Animal Reproduction Science**, v. 61, p. 221-32, 2000.

WOODWARD, E. M.; TROEDSSON, M. H. Equine breeding-induced endometritis: a review. **Journal of equine veterinary Science**. 33, 673-682, 2013.