

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese/Dissertação

Lipossomas na criopreservação de sêmen de suínos

Cléderson Idênio Schmitt

Pelotas, 2023

Cléderson Idênio Schmitt

Lipossomas na criopreservação de sêmen de suínos

Dissertação/Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Carine Dahl Corcini

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S355I Schmitt, Clederson Idenio

Lipossomas na criopreservação do sêmen suíno /
Clederson Idenio Schmitt ; Carine Dahl Corcini, orientadora.
— Pelotas, 2023.

94 f.

Tese (Doutorado) — Veterinária, Faculdade de
Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. Células espermáticas. 2. Citoxidade. 3.
Fosfatidilcolina. 4. *Holding time*. I. Corcini, Carine Dahl,
orient. II. Título.

CDD : 636.40824

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Cléderson Idênio Schmitt

Lipossomas na criopreservação de sêmen de suínos

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre/Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 15/02/2023

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Carine Dahl Corcini (Orientadora)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Fabiane Borelli Grecco
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a Izani Bonel Acosta
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Marcos Antônio Anciuti
Doutor em Produção Animal pela Universidade Federal de Pelotas

Dedico essa tese a minha família!

Agradecimentos

A Deus, ao Universo, a força superior que rege nossas vidas, nosso destino e que me deu forças para concluir mais essa etapa da minha vida.

A minha mãe por ser minha fortaleza! Meu pai que ao lado de Deus, sempre esteve presente no meu lado me dando força; que esse título é um orgulho para ele ter um filho DOUTOR, já que sempre conviveu junto a pesquisadores e professores, mas como um excelente eletricitista e sempre sonhava ter o filho doutor.

Ao meu irmão que sempre me ajudou, e incentivou a seguir os estudos e ter um doutor na família toda.

Aos meus amados avôs, emprestados! Vó Ruth e Vô Chico. Obrigada por terem me aceitados como neto. Especialmente a vó Ruth, que apesar das nossas diferenças de time, tinha-a como minha vó. Serei eternamente grato! Vocês seguem vivos neste plano, dentro do meu coração.

A minha esposa, companheira de vida e lutas, amiga fiel! Obrigada por tudo! Por me aguentar, apoiar e incentivar nos momentos que pensei em desistir de tudo e por ter encarado todas as etapas do experimento, virando madrugada dentro dos laboratórios.

A minha tia Janete e minha sogra Jussara, obrigado por me incentivarem e estarem ao meu lado nessa etapa da vida, e sempre dando bons conselhos.

As minhas filhas caninas, Lívia, Suzi e Mila! Amo vocês!!! Ao meu “afilhado canino” Rodrigo, ao papagaio Juliano, aos outros cães da família, Thor, Chocolate e “In memoriam”: Isabel, Bethoven, entre outros.

Aos vigilantes do Campus Capão do Leão da UFPel, pela companhia, segurança durante as madrugadas e finais de semana, mais ainda quando era restrito a entrada no campus decorrente da Pandemia do COVID-19.

A minha psicóloga Bruna, por ter me ajudado a me conhecer melhor, a saber como trabalhar com meus medos e me incentivar a não desistir e seguir os sonhos.

A minha querida orientadora, Carine Corcini, por ter aceitado me orientar no doutorado e pelas experiências e orientações que aprendi com ela.

Aos professor Antonio Sergio, pelas trocas de conhecimento durante as nossas conversas e nas viagens ao campus, e agradeço pelos ensinamentos sobre vinho, que me tornei um grande apreciador, graças a você.

Ao colega Northon da pós-graduação, muito obrigado por ter participado das análises do seu experimento, foi um aprendizado importante.

A associação de criadores de suínos do Rio Grande do Sul (ACSURS), pelo apoio na realização do presente projeto, com envio das doses comerciais de sêmen de suínos.

As alunas da graduação e estagiárias Nicole por ter ajudado nas etapas iniciais, e ter passado madrugada dentro do laboratório realizando as análises, e a Juliana, obrigado por me ajudar na execução do experimento.

Agradecimento a CAPES/CNPQ pela bolsa de doutorado, e ao programa de pós-graduação de veterinária da UFPel.

E por fim, a cidade de Pelotas – RS, que me acolheu desde de 2014 e me apaixonei pela cidade, e ainda quero voltar a morar e ser professor da veterinária da UFPel.

**Todos esses que aí estão atravancando meu caminho,
Eles Passarão...
Eu Passarinho! (Mário Quintana)**

Resumo

SCHMITT, Cléderson Idênio. **Lipossomas na criopreservação de sêmen de suínos**. 2023. 94f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

No Brasil, a inseminação artificial, representa 95% dos acasalamentos, sendo que mais de 99% são realizadas com sêmen refrigerado a 17°C, por causa o processo de criopreservação ocasiona diversos danos aos espermatozoides. Tais como, maior desidratação celular, decorrente da remoção de moléculas polares dos fosfolípidios, acarretando em alterações de funcionalidade. Com isso, pesquisas apontam que manter o sêmen diluído por até 24 horas a uma temperatura acima de 15°C é benéfico ao espermatozoide. Além disso, estudos apontam que acrescentar lipossomas ao diluente durante o processo de criopreservação, proporciona uma maior resistência dos espermatozoides ao frio. Por isso os objetivos desse estudo foram: a) avaliar a citotoxicidade do lipossoma comercial S100 com 98% de fosfatidilcolina em células espermáticas de suínos; b) avaliar do lipossoma comercial S45 junto a diluente de refrigeração em células espermáticas de suínos armazenadas a 17°C e 5°C. No primeiro estudo, foi avaliado a citotoxicidade do lipossoma comercial S100, fabricado pelo processo de injeção de etanol, com 98% de fosfatidilcolina comercial Lipoid GmbH (Alemanha), sendo acrescentados ao diluente plasma lactose, sendo testadas quatro diluições a 5°C e a 17°C de resfriamento por até quatro dias. No segundo estudo, foi avaliar a adição do lipossoma comercial S45, produzido com lecitinas de soja desengorduradas com >45% m/m fosfatidilcolina, 10–18% m/m fosfatidiletanolamina, <4% m/m lisofosfatidilcolina e <3% m/m triacilgliceróis, junto a diluente de refrigeração no processo *holding time* por até 72h a 17°C e a 5°C. Em ambos estudos se utilizou células espermáticas de dez machos diferentes (~ 80mL com ~2,6 bilhões de espermatozoides, cada dose) da mesma linhagem, mantidos em baias individuais e recebendo a mesma ração. Além disso, em ambas pesquisas, usou-se quatro diluições de lipossomas (5nM, 3,75nM, 2,5nM, 1,25nM e 0nM), avaliou-se a cinética espermática pelo sistema automatizado CASA, avaliando MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, BCF, ALH, DCL, DSL, DAP. A partir dos resultados, notou-se que no primeiro estudo, o lipossoma S100 apresenta uma alta citotoxicidade em todas as concentrações avaliadas, principalmente quando se armazena as células espermáticas a 5°C, e quando armazenadas a 17°C a concentração de 1,25nM. No segundo estudo, os resultados demonstraram que o armazenamento a 17°C com a adição de lipossomas proporcionou ganho na cinética espermática, e as doses armazenadas a 5°C, com a adição de lipossomas

permaneceram viáveis por 24h de armazenamento. Assim conclui-se que o uso do lipossoma S45 pode ser viável no processo de criopreservação do sêmen suíno por proporciona uma melhora nos resultados dos parâmetros da cinética espermática. E uso de lipossomas com alta concentração de fosfatidilcolina, como o caso do lipossoma S100, é citotóxico para as células espermáticas de suínos, devendo ser evitado o seu uso.

Palavras-chave: criopreservação; lipossoma; *holding time*; suíno; fosfatidilcolina

Abstract

SCHMITT, Cléderson idênio. **Lipossomas na criopreservação de sêmen de suínos**. 2023. 94f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

In Brazil, artificial insemination represents 95% of mating, and more than 99% are performed with semen refrigerated at 17°C, because the cryopreservation process causes various damage to spermatozoa. Such as, greater cellular dehydration, resulting from the removal of polar molecules from phospholipids, resulting in changes in functionality. With this, pesquisas point out that keeping the semen diluted for up to 24 hours at a temperature above 15°C is beneficial to sperm. In addition, studies indicate that adding liposomes to the diluent during the cryopreservation process provides greater resistance of sperm to cold. Therefore, the objectives of this study were: a) to value the cytotoxicity of commercial liposome S100 with 98% phosphatidylcholine in swine spermatic cells; (b) evaluate of commercial liposome S45 with refrigeration diluent in swine swine cells stored at 17°C and 5°C. In the first study, the cytotoxicity of the commercial liposome S100, manufactured by the ethanol injection process, with 98% of commercial phosphatidylcholine Lipoid GmbH (Germany), was evaluated, being added to the plasma lactose diluent, being tested four dilutions at 5°C and 17°C of cooling for up to four days. In the second study, we evaluated the addition of commercial liposome S45, produced with defatted soy lecithin with >45% m/m phosphatidylcholine, 10–18% m/m phosphatidyllectolamine, <4% m/m lysophosphatidylcholine and <3% m/m triacylglycerols, along with the cooling diluent in *the holding time process* for up to 72h to 17°C and 5°C. In both studies, sperm cells of ten different males (~ 80mL with ~2.6 billion sperm, each dose) of the same lineage, kept in individual stalls and receiving the same ration, were used. In addition, in both studies, four dilutions of liposomes (5nM, 3.75nM, 2.5nM, 1.25nM and 0nM) were used, the spermatic kinetics was evaluated by the automated CASA system, evaluating MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, BCF, ALH, DCL, DSL, DAP. From the results, it was observed that in the first study, the liposome S100 presents a high cytotoxicity in all concentrations evaluated, especially when storing the spermatic cells at 5°C, and when stored at 17°C the concentration of 1.25nM. In the second study, the results showed that storage at 17°C with the addition of liposomes provided gain in sperm kinetics, and doses stored at 5°C, with the addition of liposomes remained viable for 24 h of storage. Thus, it is concluded that the use of liposome S45 may be feasible in the cryopreservation process of swine semen by providing an improvement in the results of the parameters of the kinetic spermatids. And use of liposomes with high concentration of phosphatidylcholine, as the case of liposome S100, is cytotoxic to

Keywords: cryopreservation; liposome; *holding* time; pig; phosphatidylcholine

Lista de Tabelas

Artigo 3

Tabela 1	Caracterização diâmetro médio (Dh), índice de polidispersividade (IPd), Potencial- ζ e pH do lipossoma	52
Tabela 2	Tratamentos e concentrações do lipossoma	53
Tabela 3	Resultados da Cinética espermática a 17°C usando 1nmol de Lipossoma.....	55

Artigo 4

Tabela 1	Caracterização diâmetro médio (Dh), índice de polidispersividade (IPd), Potencial- ζ e pH do lipossoma ..	66
Tabela 2	Tratamentos e concentrações do lipossoma	67
Tabela 3	Valores da cinética espermática das doses armazenadas a 17°C em diferentes concentrações de lipossoma S45 ..	69
Tabela 4	Valores da cinética espermática das doses armazenadas a 17°C em diferentes concentrações de lipossoma S45 ..	71
Tabela 5	Valores da cinética espermática das doses armazenadas a 5°C em diferentes concentrações de lipossoma S45	72

Lista de Abreviaturas e Siglas

ALH	Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça em relação ao trajeto médio
BCF	Frequências de Batimentos Flagelar
CASA	<i>Computer-Assisted Sperm Analysis</i>
DAP	Distância percorrida do traçado médio
DCL	Distância percorrida do traçado curvilíneo
DSL	Distância percorrida do traçado em linha reta
HSP70	Heat-shock Protein 70kDa
H.T	<i> Holding Timer</i>
LIN	Linearidade
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
VAP	Velocidade do Traçado Médio ($\mu\text{m/s}$)
VCL	Velocidade Curvilínea ($\mu\text{m/s}$)
VSL	Velocidade Linear Progressiva ($\mu\text{m/s}$)
WOB	Coeficiente de oscilação (VAP/VCL)

Lista de Símbolos

nM	Nanomolar
mL	Microlitros
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem
®	Marca Registrada

Sumário

1 Introdução.....	17
2 Artigos.....	20
2.1 Artigo 1.....	21
2.2 Artigo 2.....	35
2.3 Artigo 3.....	49
2.4 Artigo 4.....	61
4 Considerações Finais.....	77
Referências.....	78

1 Introdução

O Brasil é um dos maiores produtores de carne suína, estando na quarta posição mundial, e a suinocultura movimenta muito a economia do país. Sendo que o mercado da suinocultura no Brasil, está em crescente expansão e dados apontam que em 2021 ocorreu um aumento de 5,97% no consumo de carne suína em relação a 2020 e 2.015.000 matrizes alojadas em 2021 (ABPA, 2022). Com isso, se faz necessário a compreensão da dinâmica reprodutiva da espécie e o desenvolvimento de novas tecnologias, são necessários para melhorar a eficiência da produção de produtos de origem animal (DAVIS; WHITE, 2020).

E dentro da pecuária, um dos pontos importantes é a inseminação artificial (IA) por contribuir para o melhoramento genético, diminuir barreiras geográficas e a disseminação de doenças (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020a). E quando se trata da I.A em suínos, é amplamente difundida em todo o mundo, ocorrendo em mais de 90% das criações de suínos nos países ocidentais (KNOX, 2015; RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013). Já no Brasil, a I.A representa 95% dos acasalamentos dentro da suinocultura, isso mostra que a I.A está bem difundida, como ocorre na União Europeia que também tem a mesma taxa (WABERSKI; RIESENBECK *et al.*, 2019).

E dentro da I.A a criopreservação de espermatozoides é importante procedimento que ajuda no desenvolvimento genético entre outros benefícios que se tornou como padrão o uso do sêmen congelado (YÁNEZ-ORTIZ; CATALÁN *et al.*, 2022). Entretanto em suínos, a maioria das I.A ocorre com utilizando sêmen diluído e acondicionado no estado líquido entre 15 e 18°C por um período até cinco dias (BIANCHI; MADEIRA *et al.*, 2011).

Isso ocorre decorrente que o processo de criopreservação do sêmen suíno ocasiona diversos danos aos espermatozoides e resulta depois em número de leitegada menor (WABERSKI; RIESENBECK *et al.*, 2019). Não ocorrendo em uma escala comercial, por ocorrer diversos danos aos espermatozoides causados pelo frio

(PASCHOAL; LUTHER *et al.*, 2020). Por isso, o uso de sêmen criopreservado está restrito ao uso por empresas que trabalham com genética, pois há necessidade de apoiar os mercados de exportação e as pesquisas envolvendo a busca de novas tecnologias na criopreservação (YÁNEZ-ORTIZ; CATALÁN *et al.*, 2022).

Diante dessa questão, estudos vêm sendo desenvolvidos buscando compreender os danos aos espermatozoides e como esses danos podem ser evitados/reduzidos durante o processo de criopreservação (YESTE, 2017). Entre as linhas de pesquisa, algumas buscam alternativas para evitar/reduzir esses danos nos espermatozoides. Dentro delas, está se estudando o processo *holding time* (H.T), que consiste basicamente num tempo de espera antes de realizar o processo de criopreservação. Normalmente, o sêmen é diluindo com o *Beltville Thawing Solution* (BTS) e mantido por 24 horas a 15°C, antes de ocorrer o processo de criopreservação (SCHMID; HENNING *et al.*, 2013). Nesse contexto do H.T diversas pesquisas apontam que ele é benéfico ao espermatozoide (CASAS; ALTHOUSE, 2013; ERIKSSON; VAZQUEZ *et al.*, 2001; GALE; GIL *et al.*, 2015; TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014; YESTE; ESTRADA *et al.*, 2014).

Além disso, pesquisas buscam realizar mudanças nesse processo do *holding time*, que pode ser incluído uso de antioxidantes, mudanças na temperatura de armazenamento e também no tempo de armazenamento (TORRES; PEDROSA *et al.*, 2022). Nesse contexto, podemos usar lipossomas (LIPO) os quais são vesículas coloidais compostas de lipídeos anfipáticos, em excesso de água se agregam formando bicamadas lipídicas esféricas com compartimento interno aquoso (BALBINO; AOKI *et al.*, 2013; TAOUZINET; FATMI *et al.*, 2021).

Com isso, eles podem ser utilizados para incorporar moléculas de ATP e lipídios exógenos para membrana plasmática dos espermatozóides (HE; BAILEY *et al.*, 2001; MEHDIPOUR; DAGHIGH KIA *et al.*, 2017), ser carreadores de antioxidantes como β caroteno (MICHELON; MANTOVANI; *et al.*, 2016). E o uso dele no processo da criopreservação, resultados mostram que há melhorara da eficácia da regeneração da membrana plasmática (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b). Já foi avaliado o uso como crioprotetores seminal em: equinos (MEDINA-LEÓN; DOMÍNGUEZ-MANCERA *et al.*, 2019; PILLET; LABBE *et al.*, 2012), búfalo (KUMAR; SAINI *et al.*, 2015), ovinos (LUNA-OROZCO; GONZÁLEZ-RAMOS *et al.*, 2019; MAFOLO; PILANE *et al.*, 2020; MORTAZAVI; ESLAMI *et al.*, 2020), suínos (HE; BAILEY *et al.*, 2001), e bovinos

(RÖPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011), e os resultados são promissores o uso de lipossomas no processo de criopreservação seminal.

Como apontado por TORRES; MONTEIRO *et al.* (2019) que o processo *holding time* é eficaz para melhora dos parâmetros da cinética espermática e que se pode realizar mudanças nesse processo visando obter melhores resultados. O presente estudo tem como objetivo geral avaliar o uso de lipossomas a base de fosfatidilcolina junto ao diluente de refrigeração no processo *holding time*. Dento como objetivos específicos estão: Avaliar a citotoxicidade do lipossoma comercial S100 com 98% de fosfatidilcolina em células espermáticas de suínos; e avaliar a adição do lipossoma comercial S45 junto a diluente de refrigeração no processo *holding time* por até 72h a 17°C e a 5°C. Por fim, estes objetivos levaram a experimentos que estão compilados na tese na forma de artigos.

2 Artigos

2.1 Artigo 1

**USO DO *HOLDING TIME* NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN
SUÍNO**

Cléderson Idênio Schmitt
Fernanda Dagmar Martins Krug
Andreia Nobre Anciuti
Antonio Sergio Varela Junior
Carine Dahl Corcini

Submetido à Revista Interação Interdisciplinar - UNIFIMES

USO DO *HOLDING TIME* NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO

USE OF *HOLDING TIME* IN THE PROCESS OF CRYOPRESERVATION OF SWINE SEMEN

Cléderson Idênio Schmitt¹
Fernanda Dagmar Martins Krug²
Andreia Nobre Anciuti³
Juliana Ribeiro Pegoraro⁴
Cristiana Lima Dora⁵
Rodrigo Dessesards Jardim⁶
Antonio Sergio Varela Junior⁷
Carine Dahl Corcine⁸

Resumo: A criopreservação na suinocultura não ocorre em escala comercial, por ocorrer diversos danos aos espermatozoides causados pelo frio. Na busca de reduzir os danos provocados pelo processo de criopreservação, como mudança de fase fluida para a fase gel, ocorre maior desidratação celular, decorrente da remoção de moléculas polares dos fosfolipídios, acarretando em alterações de funcionalidade. Pesquisas apontam que manter o sêmen diluído por até 24 horas a uma temperatura acima de 15°C é benéfico ao espermatozoide. O tempo de espera, é denominado genericamente de *holding time* (H.T), que facilita a criopreservação do sêmen suíno. Com isso, a presente revisão abordar o uso do *holding time* no processo de criopreservação. No qual é o período de refrigeração lenta, que ocorre antes da criopreservação, onde o sêmen fica ligeiramente diluído em meio de refrigeração e em contato com seu próprio plasma seminal. Ainda se sabe que o armazenamento a 17°C e confere, entre outras alterações, maior resistência a procedimentos estressantes como choque frio e estresse osmótico durante a criopreservação espermática. Pesquisas mais aprofundadas, envolvendo o metabolismo dos espermatozoides e resultados mostraram que durante o HT ocorre um aumento nos níveis de fosforilação dos resíduos de serina da proteína HSP70 (heat-shock protein 70kDa) e esse aumento é correlacionado com o aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos. Concluímos que o processo *holding time* antes de realizar a criopreservação dos espermatozoides pode proporcionar uma melhor estabilidade a membrana plasmática, principalmente quando fica por 24h a 17°C e também em melhora da motilidade após o descongelamento.

¹Professor EBTT do Instituto Federal Farroupilha – Campus Frederico Westphalen – RS/ Doutorando em Veterinária pelo PPGV – UFPel, Médico Veterinário, Mestre em Zootecnia. schmittproducoes@gmail.com

²Professora Universitária – Ueff, Médica Veterinária, Doutora em Veterinária pelo PPGV – UFPel, fernandadmkrug@gmail.com

³Médica Veterinária do Biotério Central da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Doutora em Veterinária pelo PPGV – UFPel. vet.andreia@gmail.com

⁴Graduanda em Veterinária – Laboratório de Reprodução Animal Comparada – UFPel, ribeiropegoraro@gmail.com

⁵Farmacéutica, Doutora em Farmácia, Professora Adjunta III de Farmacologia no Instituto de Ciências Biológicas na Universidade Federal do Rio Grande, coordenadora do Laboratório de Nanotecnologia da FURG.

⁶Médico Veterinário, Professor Associado II do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio Grande, Brasil

⁷Professor Efetivo da FURG, Médico Veterinário, Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande. Docente permanente no Programa consolidado de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e no Programa emergente de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais. varelajras@gmail.com

⁸Professora Efetiva da UFPel, Médica Veterinária, Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas. Docente permanente no Programa consolidado de Pós-Graduação em Medicina Veterinária e no Programa emergente de Pós-Graduação em Biologia de Ambientes Aquáticos Continentais. corcinicd@gmail.com

Palavras-chave: *holding time*, inseminação artificial, espermatozoides, crioinjúrias

Abstract: Cryopreservation in pig farming does not occur on a commercial scale, because there are several damages to sperm caused by cold. In the search to reduce the damage caused by the cryopreservation process, such as a change from fluid phase to the gel phase, there is greater cellular dehydration, resulting from the removal of polar molecules from phospholipids, resulting in changes in functionality. Pukis point out that keeping the semen diluted for up to 24 hours at a temperature above 15°C is beneficial to superman. The waiting time is generically called *holding time* (H.T), which facilitates cryopreservation of pig semen. With this, this review addresses the use of *holding time* in the cryopreservation process. In what is the period of slow cooling, which occurs before cryopreservation, where the semen is slightly diluted in refrigeration medium and in contact with its own seminal plasma. It is still known that storage at 17°C and confers, among other changes, greater resistance to stressful procedures such as cold shock and osmotic stress during spermatocryopreservation. Further research involving sperm metabolism and results has shown that during HT there is an increase in phosphorylation levels of hsp70 protein serine residues (heat-shock protein 70kDa) and this increase is correlated with increased cryotolerance of swine spermatozoa. We conclude that the *holding time process* before performing cryopreservation of sperm can provide better stability to the plasma membrane, especially when it is for 24h to 17°C and also in improvement of motility after thawing.

Keywords: holding time, artificial insemination, sperm, cryoinjury

Introdução:

O Brasil é um dos maiores produtores de carne suína, estando na quarta posição mundial, e a suinocultura movimenta muito a economia do país. Sendo que o mercado da suinocultura no Brasil, está em crescente expansão e dados apontam que em 2021 ocorreu um aumento de 5,97% no consumo de carne suína em relação a 2020 e 2.015.000 matrizes alojadas em 2021 (ABPA, 2022). Com isso, se faz necessário a compreensão da dinâmica reprodutiva da espécie e o desenvolvimento de novas tecnologias, são necessários para melhorar a eficiência da produção de produtos de origem animal (DAVIS; WHITE, 2020).

E dentro da pecuária, um dos pontos importantes é a inseminação artificial (IA) por contribuir para o melhoramento genético, diminuir barreiras geográficas e a disseminação de doenças (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020). E quando se trata da I.A em suínos, é amplamente difundida em todo o mundo, ocorrendo em mais de 90% das criações de suínos

nos países ocidentais (KNOX, 2015; RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013; YESTE, 2016). Já no Brasil, a I.A representa 95% dos acasalamentos dentro da suinocultura, isso mostra que a I.A está bem difundida, como ocorre na União Europeia que também tem a mesma taxa (WABERSKI; RIESENBECK *et al.*, 2019).

A extensa aplicação de inseminação artificial na década de 1980 promoveu o desenvolvimento de diluidores de curto e longo prazo (3 até 7 dias) para armazenamento do sêmen refrigerado a 15–17°C, bem como a padronização e comercialização de cateteres e, também de procedimentos convencionais de inseminação (WM; A. *et al.*, 2000). E dentro da I.A a criopreservação de espermatozoides é importante procedimento que ajuda no desenvolvimento genético entre outros benefícios que se tornou como padrão o uso do sêmen congelado (YÁNEZ-ORTIZ; CATALÁN *et al.*, 2022). Entretanto em suínos, a maioria das I.A ocorre com utilizando sêmen diluído e acondicionado no estado líquido entre 15 e 18°C por um período até cinco dias (BIANCH; MADEIRA *et al.*, 2011).

No entanto, em suínos o uso de sêmen criopreservado tem seu uso a mais de 25 anos, está restrito a uso por fornecedores genéticos necessidades de apoiar os mercados de exportação e a pesquisas envolvendo a busca de novas tecnologias na criopreservação (YÁNEZ-ORTIZ; CATALÁN *et al.*, 2022). Não ocorrendo em uma escala comercial, por ocorre diversos danos aos espermatozoides causados pelo frio (PASCHOAL; LUTHER *et al.*, 2020). Sendo uma preocupação constante, com isso estudos buscam reduzir os danos provocados pelo processo de criopreservação (YESTE; RODRÍGUEZ-GIL *et al.*, 2017).

E hoje diversos estudos buscam compreender os principais danos que ocorrem aos espermatozoides desde do processo da coleta até o processo de descongelamento. Outras linhas de pesquisa buscam alternativas para evitar ou reduzir esses danos que ocorrem aos espermatozoides. E uma das linhas de pesquisa que já se foi trabalhada por CORRÊA; JÚNIOR *et al.* (2004) foi desenvolver um diluente que pudesse proporcionar uma proteção dos espermatozoides armazenados a 5°C. Nesse mesmo contexto de armazenar a 5°C, PASCHOAL; LUTHER *et al.* (2020) aponta diversos benefícios, como diminuição da carga bacteriana. Com isso surge uma possibilidade de armazenamento, no entanto é importante compreender as principais alterações que ocorrem quando armazenamos a 5°C ou quando realizamos o congelamento e como podemos atuar para ocorrer ou diminuir esses danos.

Nessa perspectiva, o sêmen de suíno apresenta alta sensibilidade a mudanças de temperatura, entre 30°C e 10°C, decorrente da baixa relação de esterol/fosfolipídio (CASAS;

ALTHOUSE, 2013). Com isso pesquisas apontam que manter o sêmen diluído por até 24 horas a uma temperatura acima de 15°C é benéfico ao espermatozoide (SCHMID; HENNING *et al.*, 2013). Esse tempo de espera, é denominado genericamente de *holding time* (H.T), facilitando a criopreservação do sêmen suíno (CASAS; ALTHOUSE, 2013b; ERIKSSON; VAZQUEZ *et al.*, 2001; GALE; GIL; MALO; GONZÁLEZ *et al.*, 2015; TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014; YESTE, MARC; ESTRADA, EFRÉN *et al.*, 2014). Á vista disso, pretende-se com a presente revisão abordar o uso do *holding time* no processo de criopreservação.

Principais danos que ocorrem as células espermáticas de suínos

O sêmen suíno, após a coleta o sêmen é diluído (1:1 até 1:5) em diluente de refrigeração, normalmente o Bestville Thawing Solution (BTS) e mantido em temperatura ambiente por 1,5 horas (TORRES; PEDROSA *et al.*, 2022). Em seguida o sêmen é refrigerado à 15 °C por no mínimo 3 horas, período denominado *holding time* [HT] (YESTE; ESTRADA *et al.*, 2014). E a partir desse processo de diminuir a temperatura dos ±25°C para os 15°C já ocasiona alterações estruturais nas células espermáticas, ocasionando estresse físico e químico da membrana plasmática (TRZCINSKA; BRYLA, 2015).

Após esse processo, ocorre a centrifugação e o pellet de espermatozoides é adicionado de um diluente à base de lactose e gema de ovo e sofre uma nova redução da temperatura até atingir 5°C (TORRES; MONTEIRO *et al.*, 2019b), onde adiciona um crioprotetor e antioxidante para depois realizar o processo de congelamento com vapor de nitrogênio (CASAS; ALTHOUSE, 2013). Depois de armazenados no nitrogênio líquido, para posterior descongelamento para realizar a I.A (TAOUZINET; FATMI *et al.*, 2021). Todos esses processos de redução da temperatura, leva a mudança de fase fluida para a fase gel, ocorrendo uma maior desidratação celular, decorrente da remoção de moléculas polares dos fosfolipídios, acarretando em alterações de funcionalidade (OLDENHOF; FRIEDEL *et al.*, 2010), ocasionando crioinjúrias nas células decorrente da água intra e extracelular (WM; A. *et al.*, 2000; YESTE, 2016).

Essas lesões que ocorrem na célula espermática durante esse processo de criopreservação podem ser induzidas diversos fatores, como composição do diluente, protocolos de congelamento e variabilidade interindividual (FRASER; STRZEŻEK *et al.*, 2014). Porém é importante compreender melhor quais são os processos que ocorrem com a célula espermática, os quais são vários danos físicos, bioquímicos e oxidativos a membrana do esperma, resultando em baixa viabilidade e capacidade de fertilização (WATSON, 2000). Ainda

essas lesões normalmente estão relacionadas a natureza frágil da membrana do espermatozoide (KNOX, 2015), além disso o processo de congelamento – descongelamento ocasiona uma redução, deslocamento lateral ou substituição de lipídios e proteínas, afetando a permeabilidade e a função celular (LEAHY; GADELLA, 2011).

Outro fator que contribui para ocorrência dos danos é a maior proporção de ácidos graxos saturados a saturados na membrana e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS). O qual é um evento fisiológico normal que ocorre durante o processo de criopreservação, mas o excesso de produção ocasiona lesões na membrana plasmática decorrente dos danos da peroxidação (SHEN; JIANG *et al.*, 2015). Essas lesões podem ser um aumento da permeabilidade da membrana (TRZCINSKA; BRYLA *et al.*, 2015) decorrente do ataque de radicais livres aos lipídios.

Diante desses fatores buscam-se alternativas para evitar/reparar os danos que ocorrem aos espermatozoides, e uma linha de estudos que vem sendo avaliada é o processo *holding time*, no qual estudos apontam como uma via para deixar os espermatozoides mais crioresistentes. O H.T é um período de refrigeração lenta que ocorre antes da criopreservação, onde o sêmen fica ligeiramente diluído em meio de refrigeração e em contato com seu próprio plasma seminal (TORRES; MONTEIRO *et al.*, 2019a). Sendo que esse tempo de espera começou a ser estudado na década de 70, por PURSEL; SCHULMAN *et al.* (1973) no qual buscaram utilizar esse período do HT para melhorar a manutenção da integridade do acrossoma espermático e da motilidade espermática quando armazenado e refrigeração à 5°C, sendo que o sêmen não deve ser diluído, e mantido a temperatura ambiente de 24 a 26 C por 1,25 a 7,25 horas. A partir desse trabalho, mais de dez anos ALMLID e JOHNSON (1988) avaliou o HT com períodos curto de 2h com a adição de glicerol.

Depois de 26 anos do primeiro estudo que avaliou o HT, ERIKSSON; VAZQUEZ *et al.* (2001), realizou modificações no processo *holding time* e avaliou três diferentes tempos de (3, 10 e 20h) e armazenados a 15°C para posterior realizar o processo de criopreservação. Os resultados na motilidade no tempo de 3h (40%) e 10h (41%) não ocorreu diferença estatística entre esses tempos. Mas entre os tempos 3h, 10h e 20h ocorre diferença estatística, onde o tempo de 20h resultou em motilidade de 36%, ou seja, os dados mostram que ao passar do tempo a motilidade diminui. No entanto, os autores destacam que HT de três horas proporciona menos danos aos espermatozoides, proporcionando uma crioresistência a esses espermatozoides.

Em 2005, GUTHRIE e WELCH (2005) deram “um passo a mais” nesse processo do tempo de espera antes de criopreservar, e passaram para 24h esse tempo, não encontraram nenhum efeito significativo do HT na sobrevivência do esperma pós-descongelamento e diminuição do potencial do tamanho da leitegada. Ou seja, se fosse inseminadas as fêmeas com esse sêmen, o número de leitões que iriam nascer seria menor ao sêmen sem o HT. Posteriormente, CASAS e ALTHOUSE (2013) avaliaram o mesmo tempo (24h de HT), não existindo diferença na motilidade entre os tratamentos (com ou sem HT). Os mesmos autores, enfatizam que deixar os espermatozoides por 24h a 17°C antes de seguir para as outras etapas do processo de criopreservação são benéficas por ocorrer modelação da fluidez de membrana quando os espermatozoides são expostos a 5°C, podendo contribuir para melhora da congelabilidade dos espermatozoides.

Além do mais, os laboratórios de criopreservação são distantes das centrais de sêmen, com isso necessitando que o sêmen seja diluído em um meio de refrigeração e mantido na faixa de 15° a 17°C e transportado em até 24h (TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). Com base nessa questão, estudos buscam aprofundar mais ainda a questão do tempo sobre a qualidade espermática no processo de criopreservação. Associado a essa questão e tendo como base estudos anteriores, onde não ocorreu diferença em alguns casos na motilidade e deixar os espermatozoides incubando a 24h proporciona uma remodelação da membrana plasmática. YESTE; ESTRADA *et al.* (2014) propôs avaliar a função espermática pós-descongelamento e na sobrevivência dos espermatozoides, avaliando dois diferentes HTs (3h e 24h) afetam a estrutura da nucleoproteína, fragmentação do DNA, integridade da membrana espermática e distúrbio lipídico e motilidade espermática. E os resultados mostraram que durante o HT ocorre um aumento nos níveis de fosforilação dos resíduos de serina da proteína HSP70 (heat-shock protein 70 kDa) e esse aumento é correlacionado com o aumento da criotolerância dos espermatozoides suínos.

Anteriormente nos outros trabalhos somente tinha-se suposições que o processo *holding time* proporciona melhoras na criopreservação do sêmen. No entanto, a partir desses estudos do YESTE e colaboradores (2014) ocorreu uma melhor compreensão dos danos aos espermatozoides. Nesse ponto é possível compreender que existe algum mecanismo de regulação que modula a fisiologia espermática durante o armazenamento a 17°C e confere, entre outras alterações, maior resistência a procedimentos estressantes como choque frio e estresse osmótico durante a criopreservação espermática (YESTE; ESTRADA *et al.*, 2014).

Posteriormente aos estudos de YESTE; ESTRADA *et al.* (2014) que podemos considerar um avanço na avaliação do HT, VALENCIA; GÓMEZ *et al.* (2017) pois aprofundaram as avaliações com o estudo da bioquímica dos espermatozoides, avaliando duas proteínas a proteína da doença de Niemann-Pick tipo C2 (NPC2) e a proteína do choque térmico alfa de 90 kDa (HSP90a) e prostaglandina D sintase do tipo lipocalina (L-PGDS). Para compreender o objetivo do trabalho, se faz necessário compreender a função dessas proteínas e sua relação com o espermatozoide. A HSP90a, é considerada proteína de choque, ou seja, está envolvida na resistência dos espermatozoides para resistir à criopreservação, possivelmente como chaperonas moleculares de proteínas iniciais das cascatas de fosforilação representadas por treonina/serina quinase ou tirosina quinase (ECROYD; JONES *et al.*, 2003).

Além do fato de que a função primária do HSP é a conservação dessas enzimas, corrigindo defeitos ocorridos durante o enovelamento ou dano por desnaturação devido ao estresse térmico ou oxidativo, evitando assim sua agregação de forma irreversível (WANG; SHU *et al.*, 2005). A escolha da HSP90a para avaliar se dá por se encontrar intracelularmente em menor quantidade em espermatozoides de baixa congelabilidade do que em espermatozoides de maior congelabilidade (CASAS; SANCHO *et al.*, 2010; VALENCIA; GÓMEZ *et al.*, 2017), possivelmente devido à sua saída dos espermatozoides para o espaço extracelular devido à perda da integridade da membrana plasmática durante o resfriamento (HUANG; KUO *et al.*, 1999). A associação entre HSP90a e congelabilidade pode ser atribuída à sua participação nos processos de capacitação e apoptose (CASAS; SANCHO *et al.*, 2010; CASAS; SANCHO *et al.*, 2009), além disso, sabe-se que o congelamento induz a apoptose dos espermatozoides reduzindo o tempo de viabilidade dessas células (HUANG; KUO *et al.*, 1999).

A outra proteína a NPC2 está intimamente relacionada com a estrutura lipídica da membrana plasmática (CASAS; SANCHO *et al.*, 2009), contribuindo para o transporte de colesterol endossomal para as mitocôndrias (KENNEDY; CHARMAN *et al.*, 2012). Além dela ser um fator decapacitante, evitando a capacitação do espermatozoide, que se liga mais eficientemente aos espermatozoides com maior teor de colesterol (LÉGARÉ; THABET *et al.*, 2006). Com isso, podemos compreender que essas proteínas podemos identificar os reprodutores que possam ter uma melhor crio-resistência, já que elas podem ser encontradas no plasma seminal (VALENCIA; YESTE *et al.*, 2020).

Diante dessas questões bioquímicas, começou-se a estudar as possíveis alterações bioquímicas nos espermatozoides no processo HT, entre outros tipos de estudos que buscam os

biomarcadores de criotolerância dos espermatozoides dentre alguns estudos (TORRES; PEDROSA *et al.*, 2022) que buscaram investigar a relação entre as alterações induzidas por HT em espermatozoides suínos/plasma seminal, metabólitos e congelabilidade do esperma. Podemos considerar que esse estudo vem dar continuidade e avanço no HT, no qual normalmente se avalia os parâmetros de cinética e da qualidade.

Partindo dessa premissa dos estudos de TORRES; PEDROSA *et al.* (2022), se faz necessário compreender que o ejaculado do cachaco apresenta três frações com base em sua aparência oportuna e concentração espermática sendo classificada de acordo com SARAVIA; WALLGREN *et al.* (2009); a “fração pré-espermática (PSF)”, a “fração rica em espermatozoides (SRF, que contém >80–90% de todos os espermatozoides ejaculados)” e a “fração pós-rica em espermatozoides (PSRF)”. Sendo que os espermatozoides estão suspensos em um fluido heterogêneo, o plasma seminal (SP), composto por secreções originadas dos ductos do epidídimo e das glândulas sexuais acessórias (SPJUTH; JOHANNISSON *et al.*, 2007), que marcam claras diferenças qualitativas e quantitativas na composição bioquímica das proporções de eletrólitos e proteínas entre as frações do ejaculado (CÓRDOVA; PÉREZ-GUTIÉRREZ *et al.*, 2002).

Compreendendo essas questões que podemos ter essa divisão do ejaculado e que os espermatozoides são suspensos no plasma seminal e baseado nisso, eles podem ajudar a classificar os espermatozoides em bons congeladores (GEF) e ruins congeladores (PEF) (TORRES; PEDROSA *et al.*, 2022). Com isso os avanços mais recentes desenvolvidos por (TORRES; MONTEIRO *et al.*, 2019a; TORRES; PEDROSA *et al.*, 2022) apontam que os espermatozoides do GEF utilizam inosina-hipoxantina como fonte de energia durante o HT, preservando outros tipos de fontes de energia/metabolismo como creatina/creatina fosfato, ADP e outros substratos do ciclo de Krebs para uso pós-descongelamento. Ou seja, esses espermatozoides são mais resistentes ao frio, e que o processo *holding time* por 24h a 17° proporciona um “descanso” para o ciclo de Krebs no momento do HT.

Outro ponto que gerou esses estudos desenvolvidos por (TORRES; MONTEIRO *et al.*, 2019b; TORRES; PEDROSA *et al.*, 2022) é o plasma seminal, que pode ser retirado antes de realizar o processo HT ou não. Nesse aspecto devemos compreender o papel do plasma seminal (SP) o qual desempenha vários papéis, incluindo a modulação da função espermática, de sua capacidade de gerar energia usando substratos presentes no SP (RODRIGUEZ-MARTINEZ; MARTINEZ *et al.*, 2021). Partindo dessa premissa, existem vários estudos com

diferentes metodologias no HT, que vão desde da adição de diferentes períodos de HT aos protocolos (CASAS; ALTHOUSE, 2013; TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014), retirada e/ou adição de plasma seminal (SARAVIA; WALLGREN *et al.*, 2009; TORRES; DIAZ *et al.*, 2016; TORRES; RAVAGNANI *et al.*, 2016), adição de antioxidantes (GALE; GIL *et al.*, 2015; YESTE; ESTRADA *et al.*, 2014), alteração de protocolos de criopreservação (TORRES; DIAZ *et al.*, 2016; TORRES; RAVAGNANI *et al.*, 2016).

Apesar dessas diferenças no processo, ocorre um grande entrave nas metodologias usadas por esses autores, pois alguns estudos utilizam armazenamento a 5°C, outros 10°C, entre outras diferenças. Com isso gera pouca consistência e repetibilidade dos resultados (TORRES; PEDROSA *et al.*, 2022). Outro ponto que foi possível ver nesses estudos é a questão metodológica, onde a grande maioria dos estudos deu sequência ao estudo desenvolvido por ERIKSSON; VAZQUEZ *et al.* (2001), onde utilizou o *holding time*, realizou os demais processos relacionados a criopreservação e depois realizando as análises. Ademais podemos verificar que a temperatura, foi outro ponto bastante divergente nos estudos apresentados, alguns usaram 5°C (CASAS; ALTHOUSE, 2013), 10°C (WASILEWSKA; FRASER, 2017), 15°C (TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014; YESTE, 2015), 17°C (CASAS; ALTHOUSE, 2013; VALENCIA; GÓMEZ *et al.*, 2017; WASILEWSKA; FRASER, 2017). Ainda a grande variedade de tempos analisados, sendo de: 2h (WASILEWSKA; FRASER, 2017), 3h (GUTHRIE; WELCH, 2005), 24h (TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014).

Analisando as temperaturas utilizadas, talvez o uso de 5°C seja que necessite mais estudos do processo *holding time*, avaliar os parâmetros de cinética, qualidade espermática e se possível a questão da assinatura metabólica, para descobrir os eventos metabólicos que ocorrem a essa temperatura. Pois alguns estudos apontam que armazenar a 5°C ocasiona uma redução da carga bacteriana e com isso pode resultar na melhora dos parâmetros da cinética espermática (PASCHOAL; LUTHER *et al.*, 2020)

Considerações finais:

Podemos ver que o processo *holding time* antes de realizar a criopreservação dos espermatozoides pode proporcionar uma melhor estabilidade a membrana plasmática, principalmente quando fica por 24h a 17°C e resulta também em melhora da motilidade após o descongelamento. Mas existe uma gama de variações nessas pesquisas discutidas, que vão desde do tempo do HT, temperatura de armazenamento, entre outros fatores que podem dificultar a sua repetibilidade.

Destacamos que atualmente existem novas pesquisas mais avançadas, buscando avaliar além do tradicional (Cinética e Qualidade espermática), é estudar as rotas metabólicas das proteínas presentes no plasma seminal. Já que com isso, podemos identificar animais que possuem um ejaculado mais crioresistente, e quem sabe no futuro essas avaliações podem ser empregadas nas empresas de genéticas para trabalhar com cachacos que produzam ejaculados mais resistentes ao frio.

Agradecimentos: Este trabalho foi realizado durante bolsa financiada pela CAPES – Agência Federal de Apoio e Avaliação da Pós-Graduação do Ministério da Educação do Brasil do primeiro autor.

REFERÊNCIAS

ABPA, A. B. d. P. A. **RELATÓRIO ANUAL DA ABPA**. 2022. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/05/Relatorio-Anual-ABPA-2022-1.pdf>. Acesso em: 01.

ALMLID, T.; JOHNSON, L. A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. **J Anim Sci**, 66, n. 11, p. 2899-2905, Nov 1988.

BIANCH, I. B. I.; MADEIRA, E. M.; SCHNEIDER, A.; RABASSA, V. R.; CORRÊA, É. K.; JR, T. L.; CORRÊA, M. N. Efeito de dif o de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de r os de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, 39, 2011.

CASAS, I.; ALTHOUSE, G. C. The protective effect of a 17 degrees C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 degrees C. **Cryobiology**, 66, n. 1, p. 69-75, Feb 2013.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. **Theriogenology**, 74, n. 6, p. 940-950, Oct 1 2010.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. **Theriogenology**, 72, n. 7, p. 930-948, Oct 15 2009.

CÓRDOVA, A.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J. F.; LLEÓ, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; ALVAREZ, A.; DROBCHAK, V.; MARTÍN-RILLO, S. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep frozen boar semen packaged in 0.5 and 5 ml straws. **Theriogenology**, 57, n. 8, p. 2119-2128, 2002/05/01/ 2002.

CORRÊA, M. N.; JÚNIOR, T. L.; DESCHAMPS, J. C.; SERRET, C. G.; BORDIGNON, J.; RAMBO, G. Taxa de penetração espermática in vitro em ovócitos suínos utilizando espermatozoides acondicionados com o diluente PIGPEL-5 à 5°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, 3, 28, p. 161-169, 2004.

DAVIS, T. C.; WHITE, R. R. Breeding animals to feed people: The many roles of animal reproduction in ensuring global food security. **Theriogenology**, 150, p. 27-33, 2020/07/01/ 2020.

ECROYD, H.; JONES, R. C.; AITKEN, R. J. Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation. **Biol Reprod**, 69, n. 6, p. 1801-1807, Dec 2003.

ERIKSSON, B. M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; LUCAS, X.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. **Theriogenology**, 55, n. 8, p. 1593-1605, May 1 2001.

FRASER, L.; STRZEŻEK, J.; KORDAN, W. Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. **Anim Reprod Sci**, 147, n. 3-4, p. 119-127, Jun 30 2014.

GALE, I.; GIL, L.; MALO, C.; GONZALEZ, N.; MARTINEZ, F. Effect of *Camellia sinensis* supplementation and increasing holding time on quality of cryopreserved boar semen. **Andrologia**, 47, n. 5, p. 505-512, Jun 2015.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. **Theriogenology**, 63, n. 2, p. 396-410, 2005/01/15/ 2005.

HUANG, S. Y.; KUO, Y. H.; LEE, W. C.; TSOU, H. L.; LEE, Y. P.; CHANG, H. L.; WU, J. J.; YANG, P. C. Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. **Theriogenology**, 51, n. 5, p. 1007-1016, Apr 1 1999.

KENNEDY, B. E.; CHARMAN, M.; KARTEN, B. Niemann-Pick Type C2 protein contributes to the transport of endosomal cholesterol to mitochondria without interacting with NPC1. **J Lipid Res**, 53, n. 12, p. 2632-2642, Dec 2012.

KNOX, R. The Fertility of Frozen Boar Sperm When used for Artificial Insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, 50, n. S2, p. 90-97, 2015.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. **Reprod Domest Anim**, 46 Suppl 2, p. 7-13, Sep 2011.

LÉGARÉ, C.; THABET, M.; GATTI, J. L.; SULLIVAN, R. HE1/NPC2 status in human reproductive tract and ejaculated spermatozoa: consequence of vasectomy. **Mol Hum Reprod**, 12, n. 7, p. 461-468, Jul 2006.

OLDENHOF, H.; FRIEDEL, K.; SIEME, H.; GLASMACHER, B.; WOLKERS, W. F. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, 61, n. 1, p. 115-122, 2010/08// 2010.

PASCHOAL, A. F. L.; LUTHER, A. M.; JAKEL, H.; SCHEINPFLUG, K.; MUHLDORFER, K.; F, P. B.; WABERSKI, D. Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5 degrees C. **PLoS One**, 15, n. 6, p. e0234339, 2020.

PURSEL, V. G.; SCHULMAN, L. L.; JOHNSON, L. A. Effect of Holding Time on Storage of Boar Spermatozoa At 5 C. **Journal of Animal Science**, 37, n. 3, p. 785-789, 1973.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ESTRADA, E. Artificial Insemination in Boar Reproduction. *In*: BONET, S.; CASAS, I., *et al* (Ed.). **Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 589-607.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ, E. A.; CALVETE, J. J.; PEÑA VEGA, F. J.; ROCA, J. Seminal Plasma: Relevant for Fertility? **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n. 9, DOI: 10.3390/ijms22094368.

SAADELDIN, I. M.; KHALIL, W. A.; ALHARBI, M. G.; LEE, S. H. The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. **Animals (Basel)**, 10, n. 12, Dec 3 2020.

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PEÑA, F. J.; ROCA, J.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. **Theriogenology**, 71, n. 4, p. 662-675, Mar 1 2009.

SCHMID, S.; HENNING, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F.; PETRUNKINA, A. M.; WABERSKI, D. The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermically stored boar spermatozoa. **Andrology**, 1, n. 3, p. 376-386, May 2013.

SHEN, T.; JIANG, Z. L.; LIU, H.; LI, Q. W. Effect of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides on boar spermatozoa during freezing-thawing. **Anim Reprod Sci**, 159, p. 25-30, Aug 2015.

SPJUTH, L.; JOHANNISSON, A.; LUNDEHEIM, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Early pre-pubertal exposure to low-dose oral di(2-ethylhexyl) phthalate does not affect sperm

plasma membrane stability, acrosomal integrity or chromatin structure in the post-pubertal boar. **Theriogenology**, 68, n. 2, p. 186-195, 2007/07/15/ 2007.

TAOUZINET, L.; FATMI, S.; LAHIANI-SKIBA, M.; SKIBA, M.; IGUER-OUADA, M. Encapsulation Nanotechnology in Sperm Cryopreservation: Systems Preparation Methods and Antioxidants Enhanced Delivery. **Cryo Letters**, 42, n. 1, p. 1-12, Jan-Feb 2021.

TOMÁS, C.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; DE MERCADO, E. Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, 144, n. 3, p. 115-121, 2014/01/30/ 2014.

TORRES, M. A.; DIAZ, R.; BOGUEN, R.; MARTINS, S. M.; RAVAGNANI, G. M.; LEAL, D. F.; OLIVEIRA MDE, L.; MURO, B. B.; PARRA, B. M.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, J. A., Jr.; ALVARENGA, M. A.; MORETTI ADE, S.; SEPULVEDA, N.; DE ANDRADE, A. F. Novel Flow Cytometry Analyses of Boar Sperm Viability: Can the Addition of Whole Sperm-Rich Fraction Seminal Plasma to Frozen-Thawed Boar Sperm Affect It? **PLoS One**, 11, n. 8, p. e0160988, 2016.

TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; PASSARELLI, M. S.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, J. A., Jr.; ALVARENGA, M. A.; MARTINS, S.; DE ANDRADE, A. F. C. The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to short-cryopreservation protocols. **Cryobiology**, 86, p. 58-64, Feb 2019a.

TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; PASSARELLI, M. S.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, J. A., Jr.; ALVARENGA, M. A.; MARTINS, S.; DE ANDRADE, A. F. C. The ideal holding time for boar semen is 24h at 17 degrees C prior to short-cryopreservation protocols. **Cryobiology**, 86, p. 58-64, Feb 2019b.

TORRES, M. A.; PEDROSA, A. C.; NOVAIS, F. J.; ALKMIN, D. V.; COOPER, B. R.; YASUI, G. S.; FUKUMASU, H.; MACHATY, Z.; DE ANDRADE, A. F. C. Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability†. **Biology of Reproduction**, 106, n. 1, p. 213-226, 2022.

TORRES, M. A.; RAVAGNANI, G. M.; LEAL, D. F.; MARTINS, S. M.; MURO, B. B.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, J. A.; ALVARENGA, M. A.; MORETTI, A. S.; DE ANDRADE, A. F. Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. **J Anim Sci**, 94, n. 5, p. 1906-1912, May 2016.

TRZCINSKA, M.; BRYLA, M. Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. **Pol J Vet Sci**, 18, n. 3, p. 473-480, 2015.

TRZCINSKA, M.; BRYLA, M.; GAJDA, B.; GOGOL, P. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Theriogenology**, 83, n. 3, p. 307-313, Feb 2015.

VALENCIA, J.; GÓMEZ, G.; LÓPEZ, W.; MESA, H.; HENAO, F. J. Relationship between HSP90a, NPC2 and L-PGDS proteins to boar semen freezability. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, 8, n. 1, p. 21, 2017/03/01 2017.

VALENCIA, J.; YESTE, M.; QUINTERO-MORENO, A.; NINO-CARDENAS, C. D. P.; HENAO, F. J. Relative content of Niemann-Pick C2 protein (NPC2) in seminal plasma, but not that of spermadhesin AQN-1, is related to boar sperm cryotolerance. **Theriogenology**, 145, p. 181-189, Mar 15 2020.

WABERSKI, D.; RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; WEITZE, K. F.; JOHNSON, L. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. **Theriogenology**, 137, p. 2-7, Oct 1 2019.

WANG, P.; SHU, Z.; HE, L.; CUI, X.; WANG, Y.; GAO, D. The pertinence of expression of heat shock proteins (HSPs) to the efficacy of cryopreservation in HELAs. **Cryo Letters**, 26, n. 1, p. 7-16, Jan-Feb 2005.

WASILEWSKA, K.; FRASER, L. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. **Anim Reprod Sci**, 185, p. 161-173, Oct 2017.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, 60-61, p. 481-492, 2000/07/02/ 2000.

WM; A., J. L.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL. Storage of boar semen. **Animal reproduction science**, 62, n. 1-3, 08/18/2000 2000.

YÁNEZ-ORTIZ, I.; CATALÁN, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; MIRÓ, J.; YESTE, M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. **Animal Reproduction Science**, 246, p. 106904, 2022/11/01/ 2022.

YESTE. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, 85, n. 1, 01/01/2016 2016.

YESTE, M. Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. **Reprod Domest Anim**, 50 Suppl 2, p. 71-79, Jul 2015.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; RIVERA DEL ALAMO, M. M.; BONET, S.; RIGAU, T.; RODRIGUEZ-GIL, J. E. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein

HSP70 during holding time at 17 degrees C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e90887, 2014.

2.2 Artigo 2

UTILIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNO

Cléderson Idênio Schmitt
Fernanda Dagmar Martins Krug
Izani Bonel Acosta
Carine Dahl Corcini

Submetido à revista Vivências

UTILIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNO

USE OF LIPOSOMES IN THE CRYOPRESERVATION PROCESS OF SWINE SEMEN

Resumo: O presente trabalho tem como objetivo trazer os principais vantagens e desvantagens da utilização de lipossomas no processo de criopreservação do sêmen suíno através dessa revisão bibliográfica. Pois a utilização do sêmen criopreservado na suinocultura representa 1% apenas, por causa dos danos que ocorrem durante o processo de criopreservação, no qual o sêmen passa por três etapas antes de ocorrer o congelamento, e nelas ocorre a diminuição da temperatura. Dessa forma, ocorre alterações físicas e químicas dos espermatozoides, deixando-os suscetíveis a sérios danos causados pelo frio. Além disso, a redução da temperatura, leva a mudança de fase fluida para a fase gel, ocorrendo uma maior desidratação celular, decorrente da remoção de moléculas polares dos fosfolipídios, acarretando em alterações de funcionalidade. Decorrente disso, busca-se novos crioprotetores, antioxidantes para reduzir/reparar os danos aos espermatozoides de suínos desde do processo de refrigeração até o processo de descongelamento do sêmen congelado. Em vista disso, destaca-se os lipossomas, que são vesículas coloidais compostas de lipídeos anfipáticos que em excesso de água se agregam formando bicamadas lipídicas esféricas com compartimento interno aquoso, podendo carregar antioxidantes, ATP. No entanto, eles podem ser fabricados de diferentes fosfolipídios, desde da gema de ovo até lecitina de soja, e até mesmo o processo de fabricação podem ser diferentes. Nota-se que a utilização de lipossomas no processo de criopreservação de sêmen, é uma alternativa para evitar/reparar os danos que ocorrem aos espermatozoides durante esse processo.

Palavras-chave: lipossomas. criopreservação. suíno. fosfolipídios. lecitina de soja.

Abstract: The present work aims to bring the main advantages and disadvantages of the use of liposomes in the cryopreservation process of swine semen through this literature review. Because the use of cryopreserved semen in pig farming represents only 1%, because of the damage that occurs during the cryopreservation process, in which the semen goes through three stages before freezing occurs, and in them there is a decrease in temperature. Thus, physical and chemical changes occur in spermatozoa, leaving them susceptible to serious damage caused by cold. In addition, the reduction of temperature leads to the change of fluid phase to the gel phase, occurring a greater cellular dehydration, resulting from the removal of polar molecules from phospholipids, resulting in changes in functionality. As a result, new cryoprotects, antioxidants are sought to reduce/repair the damage to pig sperm from the refrigeration process to the process of thawing frozen semen. In view of this, liposomes stand out, which are colloidal vesicles composed of amphipathic lipids that add to excess water forming spherical lipid bilayers with aqueous inner compartment, and may carry antioxidants, ATP. However, they can be manufactured from different phospholipids, from egg yolk to soy lecithin, and even the manufacturing process may be different. It is noted that the use of liposomes in the process of cryopreservation of semen, is an alternative to avoid/repair the damage that occurs to sperm during this process.

keywords: liposomes. cryopreservation. swine. phospholipids. soy lecithin.

Introdução

O Brasil é o quarto maior produtor de carne suína, dados recentes de 2021 apontam uma

produção de 4,701 milhões de toneladas de carne e possuía 2.015.000 matrizes alojadas. E para termos chegado a esses números, os suinocultores utilizam tecnologias de ponta, entre elas podemos destacar a utilização da inseminação artificial. Praticada mundialmente e é a biotecnologia mais aplicada e eficaz na reprodução de suíno, e alcançou um alto grau de eficiência na maioria dos principais países produtores de carne suína e contribuiu muito para a saúde do rebanho e o progresso genético (WABERSKI; RIESENBECK *et al.*, 2019). Sendo mundialmente difundida em mais de 90% dos países produtores de carne suína (KNOX, 2015; RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013; YESTE, M., 2016). No Brasil a proporção de acasalamento por I.A é 95%, percentual semelhante aos outros maiores produtores de suínos, como na União Europeia, segundo maior produtor de suínos, tem o mesmo percentual do Brasil, que é o quarto lugar (WABERSKI; RIESENBECK *et al.*, 2019). No entanto, a maioria das inseminações artificiais (I.A) ocorre com utilizando sêmen diluído e acondicionado no estado líquido entre 15 e 18°C por um período até cinco dias (BIANCHI; MADEIRA *et al.*, 2011), diferente das demais espécies como a bovina que é comumente utilizada a criopreservação.

A não utilização do sêmen criopreservado deve-se ao processo de congelamento-descongelamento, que afeta as células espermáticas, tendo uma capacidade de fertilização muito menor quando comparado ao sêmen resfriado (KNOX, 2015). Consequentemente, apenas 1% das I.A são realizadas com sêmen criopreservado (YESTE, 2015), sendo considerada extremamente baixas quando comparamos com outras espécies. Isso mostra que o uso da criopreservação do sêmen suíno enfrenta grandes desafios, como danos estruturais e funcionais as membranas espermáticas, oxidação dos lipídios e do material genético, alteração na estrutura e organização da membrana plasmática (JOHNSON; WEITZE *et al.*, 2000), ocasionando a diminuição do número de leitões por leitegada.

A utilização do sêmen criopreservado na suinocultura, está restrito a empresas produtoras de genética para a produção de bancos de genes, e comercialização de genética no mercado internacional (SARAVIA; WALLGREN *et al.*, 2009). Por outro lado, estudos buscam reduzir os danos provocados pelo processo de criopreservação (YESTE; RODRÍGUEZ-GIL *et al.*, 2017). Dentre desses estudos podemos destacar o processo denominado *holding time* (HT), no qual o sêmen é refrigerado à 15 °C por no mínimo três horas (YESTE; ESTRADA *et al.*, 2014). Sendo que esse processo HT pode ser alterado com o objetivo de melhorar os parâmetros da qualidade espermática (CASAS; ALTHOUSE, 2013; TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). Ainda outros estudos buscam adicionar diferentes antioxidantes (YESTE; ESTRADA *et al.*, 2014) e recentemente pesquisas buscam estudar a aplicações de nanomateriais na reprodução, através da entrega direcionada de substâncias a uma célula como: antioxidantes, antimicrobianos (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b). Os lipossomas (LIPO) são os destaques que atuam evitando/reparando danos que ocorrem nos espermatozoides durante a criopreservação (YESTE, 2017). Os quais são misturas em que as partículas dispersas têm um diâmetro compreendido entre um nanômetro e um micrometro, formadas pela automontagem de lipídios anfífilos que em excesso de água se agregam formando bicamadas lipídicas e encerrando compartimentos aquosos (BALBINO; AOKI *et al.*, 2013; TAOUZINET; FATMI *et al.*, 2021).

Os LIPO vem sendo empregados nos processos de criopreservação pela sua biocompatibilidade, não toxicidade, potencial de liberação sustentada, capacidade de atuar como veículo para compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (MORAES; CARVALHO *et al.*, 2013). Incorporando lipídios exógenos na membrana dos espermatozóides (HE; BAILEY *et al.*, 2001; MEHDIPOUR; DAGHIGH KIA *et al.*, 2017), ou serem carreadores de antioxidantes (MICHELON; MANTOVANI; *et al.*, 2016), melhorador da regeneração da membrana plasmática durante o processo de congelamento-descongelamento (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020a).

Além de ter vantagens em relação ao *low-density lipoprotein* (LDL) é a possibilidade de encapsular outras moléculas e serem semissintético (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b). Vem favorecer a transferência de lipídios e colesterol, levando ao rearranjo dos componentes da membrana celular, modificando as propriedades físico-químicas da membrana, resultando na melhoria da criotolerância dos espermatozoides (ROPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011; SULLIVAN; SAEZ, 2013). Diante dessas questões, o presente trabalho tem como objetivo trazer os principais vantagens e desvantagens da utilização de lipossomas na reprodução animal dentro do processo de criopreservação do sêmen suíno através dessa revisão bibliográfica.

Configuração do texto: Times New Roman, tamanho da fonte 12, espaçamento entrelinhas simples. O número de páginas deve ser no mínimo 10 e no máximo 20, contando com as referências finais. Palavras estrangeiras devem ser grafadas em *itálico*. Citações com mais de três (3) linhas deixar recuo de 4 cm, tamanho da fonte 10, espaçamento entrelinhas simples. Imagens devem ser numeradas com algarismos arábicos, de forma sequencial, precedido da palavra que a designa, por exemplo: Figura 1, Quadro 1, Gráfico 1, Tabela 1. O tamanho da fonte a ser utilizada na identificação da ilustração deve ser a mesma do texto. Conforme exemplificado na Figura 1.

Metodologia

Esta revisão metodológica busca analisar a utilização de lipossomas e a lecitina de soja e seus produtos no processo de criopreservação de sêmen, focando principalmente na espécie suína. Com isso realizou-se a pesquisa nas principais plataformas de busca como: CAFE do Periódicos Capes, PubMed, Sciencedirect. Foram utilizados os termos “liposomes in swine semen cryopreservation”, “liposomes in semen cryopreservation”, “soy lecithin in semen cryopreservation” e soy lecithin in swine semen cryopreservation. Foram selecionados artigos a partir do ano de 2010 até o presente momento, tanto em língua portuguesa, quanto em língua inglesa. Para uma melhor compreensão, inicialmente será abordado resumidamente as principais alterações nos espermatozoides de suínos na criopreservação e posteriormente será abordado o uso de lipossomas e lecitina de soja no processo de criopreservação.

Resultados e discussões

Embora o uso de sêmen suíno criopreservado traga muitos benefícios como criação de bancos de genética, difusão de material genético entre outros, mas menos de 1% das inseminações artificiais usam essa biotecnologia (WABERSKI; RIESENBECK *et al.*, 2019), devido à redução da fertilidade do sêmen, taxa de prenhez e tamanho da ninhada (MONTEIRO; TORRES *et al.*, 2022).

Isso ocorre por causa do processo de diminuição da temperatura que o sêmen de suíno é submetido, desde do momento da coleta até o congelamento. Sendo diluído e resfriado em três etapas, a primeira logo após a coleta e diluição, onde permanece a temperatura ambiente por 1,5h (ALMLID; STAVNE *et al.*, 2007). Em seguida o sêmen é refrigerado à 15 °C por no mínimo 3 horas (período denominado *holding time* [HT]) (YESTE; ESTRADA *et al.*, 2014). Após ocorre a centrifugação, e o pellet obtido é adicionado diluente a base de gema de ovo e armazenado a 5°C para depois ocorrer o envase e congelamento (ERIKSSON; VAZQUEZ *et al.*, 2001). Sendo todo esse processo difere de outras espécies domésticas em que é utilizada a diluição em duas etapas (TORRES; PEDROSA *et al.*, 2021).

Durante todo esse processo para realizar a criopreservação, ocorre alterações físicas e químicas dos espermatozoides, deixando-os suscetíveis a sérios danos causados pelo frio

(SHEN; JIANG *et al.*, 2016). Ocasionalmente mudanças nos espermatozoides durante uma dessas três etapas, no qual a redução da temperatura, leva a mudança de fase fluida para a fase gel, ocorrendo uma maior desidratação celular, decorrente da remoção de moléculas polares dos fosfolipídios, acarretando em alterações de funcionalidade (OLDENHOF; FRIEDEL *et al.*, 2010), ocasionando crioinjúrias nas células (WM; A. *et al.*, 2000; YESTE, 2016). Também ocorre alterações na estrutura celular, aumentando os distúrbios da membrana, no efluxo de colesterol, e essas alterações são semelhantes à capacitação do espermatozoide (PEZO; YESTE *et al.*, 2021). Por consequência, ocorre a diminuição do potencial fertilizante dessas células após a descongelação diminuindo o número de leitões por leitegada (JOHNSON; WEITZE *et al.*, 2000).

Outro fator que o espermatozoide de suíno tem de desvantagem, é possuir baixa relação esterol/fosfolipídio, ocasionando uma maior sensibilidade ao frio quando comparado com outras espécies (PASCHOAL; LUTHER *et al.*, 2020; YESTE; RODRIGUEZ-GIL *et al.*, 2017). Além de ocorrer uma super produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a causar lesões pelos danos provocados pela super peroxidação (SHEN; JIANG *et al.*, 2016). Para evitar a ocorrência de danos aos espermatozoides, utiliza-se crioprotetores como o caso da gema de ovo (GO), utilizado numa variedade de espécies (ALONSO; CASTAÑEIRA *et al.*, 2021). Pois esta possui lipoproteínas de baixa densidade (LDL) que irão interagir com as proteínas BSP presentes no plasma seminal e minimizar a remoção de lipídios da membrana espermática, o que influencia positivamente a preservação dos espermatozoides (GOODE; ELLSE *et al.*, 2018). Por essas questões ela torna-se um dos crioprotetores externos mais utilizados em protocolos para congelamento de sêmen ou quando se utiliza sêmen resfriado abaixo de 15 °C.

A partir da gema de ovo, começou-se a estudar diversas abordagens para a proteção dos espermatozoides, incluindo o uso de diferentes extensores, agentes crioprotetores, antioxidantes e componentes nutricionais (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b). Mais recentemente, vários estudos tem buscado estudar as aplicações de nanomateriais na reprodução, através da entrega direcionada de substâncias a uma célula como: antioxidantes, antimicrobianos (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b). Dentro das estratégias utilizando nanomateriais, está a utilização de lipossomas (LIPO) para evitar ou reparar os danos que ocorrem nos espermatozoides durante a criopreservação.

Atualmente na busca de novos crioprotetores, antioxidantes para reduzir/reparar os danos aos espermatozoides de suínos desde do processo de refrigeração até o processo de descongelamento do sêmen congelado. E dentro de várias linhas de pesquisas, atualmente está se destacando o uso de lipossomas, decorrente de diversos benefícios que eles trazem, os quais serão explanados a seguir.

Os lipossomas, são vesículas coloidais compostas de lipídeos anfipáticos que em excesso de água se agregam formando bicamadas lipídicas esféricas com compartimento interno aquoso (BALBINO; AOKI *et al.*, 2013; TAOUZINET; FATMI *et al.*, 2021). E, para fabricação desses lipossomas podem ser utilizados diversos lipídios, com vários comprimentos de cadeia acil: DSPC (18:0), DPPC (16:0), DMPC (14:0) ou DLPC (12:0) (RÖPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011). No entanto sendo o mais utilizado são os fosfolipídios, os quais podem ser extraídos da lecitina de soja ou não (MICHELON; *et al.*, 2016) ou ainda podemos produzir lipossomas a partir do ovo ou combinação de ambos (RÖPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011).

Os lipossomas, possuem grande aplicabilidade na indústria de alimentos devido à sua biocompatibilidade, não toxicidade, potencial de liberação sustentada, entre outras características (MICHELON; *et al.*, 2016). Além disso, apresentam biocompatibilidade, não toxicidade, potencial de liberação sustentada, capacidade de atuar como veículo para compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (MORAES; CARVALHO *et al.*, 2013). Ainda conseguem incorporar moléculas de adenosina trifosfato (ATP), lipídios exógenos (MEHDIPOUR;

DAGHIGH KIA *et al.*, 2017), podendo entregar nutrientes e drogas aos tecidos-alvo (ANTIMISIARIS; MOURTAS *et al.*, 2018; MORTAZAVI, S. H.; ESLAMI, M. *et al.*, 2020).

Quando usado no processo de criopreservação seminal, os lipossomas conseguem incorporar moléculas de ATP e ainda lipídios exógenos na membrana dos espermatozóides (HE; BAILEY *et al.*, 2001; MEHDIPOUR; DAGHIGH KIA *et al.*, 2017), podem ser carreadores de antioxidantes como β caroteno (MICHELON; MANTOVANI *et al.*, 2016), licopeno (NAJAFI; TAHERI *et al.*, 2018) e quercetina (NAJAFI; KIA *et al.*, 2020). Resultando em aumento na: motilidade total e progressiva, viabilidade, integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial em espermatozoides de galos (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b).

Além disso, os lipossomas podem ser carregados com conteúdo relacionado a lipídios como a lecitina (MEHDIPOUR; DAGHIGH KIA *et al.*, 2017), a qual possibilita melhora da eficácia da regeneração da membrana plasmática de espermatozoides de carneiros (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b). Outro ponto favorável, é suas vantagens em relação a LDL, com possibilidade de encapsular outras moléculas e serem semissintético (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b). Além de facilitar a transferência de lipídios e colesterol, levando ao rearranjo dos componentes da membrana celular, modificando as propriedades físico-químicas da membrana, resultando na melhoria da criotolerância dos espermatozoides (ROPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011; SULLIVAN; SAEZ, 2013).

Conseqüentemente, novas pesquisas surgem buscando empregar os lipossomas no processo de criopreservação do sêmen em outras diversas espécies como aditivos aditivos crioprotetores em equinos (MEDINA-LEÓN; DOMÍNGUEZ-MANCERA *et al.*, 2019; PILLET, ELODIE; LABBE, CATHERINE *et al.*, 2012), búfalo (KUMAR; SAINI *et al.*, 2015), ovinos (LUNA-OROZCO; GONZÁLEZ-RAMOS *et al.*, 2019; MAFOLO; PILANE *et al.*, 2020; MORTAZAVI, S.-H.; ESLAMI, M. *et al.*, 2020), suínos (HE; BAILEY *et al.*, 2001), e bovinos (RÖPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011). No entanto, não há um padrão na origem desses fosfolipídios utilizados na produção de lipossomas. Alguns trabalhos utilizam fosfolipídios comerciais e lipídios extraídos da membrana da cabeça do espermatozoide (HE; BAILEY *et al.*, 2001), fosfolipídios comerciais puros como 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC; 18:1) entre outros (RÖPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011), fosfolipídios produzidos a partir do leite de soja (EL-KERABY; OSMAN *et al.*, 2010). No entanto, temos alguns lipossomas que são produzidos a base de produtos de origem animal. Porém, se busca a produção de lipossomas a base de origem vegetal, visto que cada vez está se buscando o não uso de produtos de origem animal no processo de criopreservação do sêmen. Pois é uma alternativa na utilização como extensores no sêmen na refrigeração e criopreservação, por serem livres de contaminação (QURESHI; REHMAN *et al.*, 2014). Uma vez que o uso de diluente de sêmen à base de gema de ovo apresenta inúmeras desvantagens. As quais incluem a ampla gama de variabilidade na composição da gema, o risco de transmissão de doenças ou contaminação bacteriana (ANZAR; RAJAPAKSHA *et al.*, 2019b). Conseqüentemente buscase a utilização de produtos de origem vegetal para produção de lipossomas, como o a lecitina de soja, que seu uso mostrou melhora na eficácia da regeneração da membrana plasmática durante o processo de congelamento-descongelamento de espermatozoides de carneiro (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b)

Além do mais, trabalhos utilizando a lectina de soja como crioprotetores mostram a melhora nos parâmetros espermáticos quando usado junto ou em substituição aos diluentes à base de leite ou gema de ovo. Nesse aspecto já existem pesquisas utilizando-a na criopreservação de sêmen em touros, suínos, carneiros, cães, veados e camelos (ANZAR; RAJAPAKSHA *et al.*, 2019a; BUSTANI; BAIEE, 2021; EL-KERABY; OSMAN *et al.*, 2010). A lectina de soja possui componentes ativos como o ácido oleico, ácido palmítico, ácido

esteárico e fosfatidilcolina, ambos são inteiramente idênticos a gema de ovo (LAYEK; MOHANTY *et al.*, 2016). Sendo que os fosfolipídios, presente na lectina de soja, são os mesmos que estão na maioria das membranas biológicas de mamíferos e conferem estabilidade física às células espermáticas (OKE; JACOB *et al.*, 2010). Com isso, vários estudos já buscaram avaliar o uso de lectina de soja na criopreservação de sêmen, em substituição a gema de ovo (HERMANSSON, ULRIKA; JOHANNISSON, ANDERS *et al.*, 2021).

No entanto, é difícil tirar quaisquer conclusões sobre as concentrações ideais de lecitina de soja para criopreservação de sêmen ou se a concentração ideal pode variar com o tipo de lecitina (HERMANSSON, U.; JOHANNISSON, A. *et al.*, 2021). Já que há grande variação nos extensores à base de lecitina usados em estudos anteriores, tornando difícil compará-los entre si, por exemplo, a quantidade de fosfatidilcolina que eles contêm (HERMANSSON, ULRIKA; JOHANNISSON, ANDERS *et al.*, 2021). A fosfatidilcolina da soja, apresenta os componentes semelhantes a gema do ovo, e traz um excelente potencial antioxidante (JUDDE; VILLENEUVE *et al.*, 2003).

SAADELDIN; KHALIL *et al.* (2020b) destaca que os lipossomas a base de fosfolipídios (fosfatidilserina, dioleoilfosfatidilcolina, fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina e dimiristoilfosfocolina) e ácidos graxos saturados e insaturados podem se fundir com a membrana plasmática do esperma e diminuir os danos aos espermatozoides causados pelo processo de congelamento-descongelamento. Em bovinos, ocorre menor dano ao acrossomo e maior percentual de espermatozoides viáveis com menor desproporção lipídica (MIGUEL-JIMENEZ; RIVERA DEL ALAMO *et al.*, 2020). Ainda outros estudos mostram interação entre os lipossomas e as células, facilitando a transferência de lipídios e colesterol, causando um rearranjo dos componentes da membrana celular (ROPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011). Em sêmen de perus, ocorre uma incorporação de fosfolipídios nas membranas espermáticas (LONG; CONN, 2012).

Os lipossomas podem ter na sua composição diferentes fosfolipídios, variando suas propriedades (termofísica, comprimento de cadeia e saturação) e nesse sentido RÖPKE; OLDENHOF *et al.* (2011) avaliando diferentes lipossomas na criopreservação seminal de bovinos, no qual os compostos de dioleoil-glicerofosfocolina e dioleoil-glicerofosfoglicerol resultaram em maior sobrevivência pós-descongelamento, motilidade progressiva e reação acrossomica quando comparados ao dioleoil-glicerofosfocolina sozinho. Em outro estudo, PILLET, E.; LABBE, C. *et al.* (2012) utilizando lipossomas com uma mistura de fosfatidilcolina de ovo e fosfatidiletanolamina (denominados E80-lipossomas) foram eficientes na preservação da motilidade espermática pós-descongelamento em equinos. Esses resultados em outras espécies mostram sua grande potencialidade no uso junto a criopreservação do sêmen, no entanto quando se trata de suínos são poucos estudos que buscam avaliar diferentes fosfolipídios em lipossomas na criopreservação.

Outro ponto positivo dos LIPO, é a possibilidade de serem carreadores, como os antioxidantes (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020b). Pois os espermatozoides de suínos sofrem efeitos negativos causados pelas mudanças de temperatura e na osmolaridade dos meios de congelamento, há aumento da produção de radicais livres, principalmente peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (GUPTA; FINELLI *et al.*, 2021; TRZCIŃSKA; BRYŁA *et al.*, 2015), o que leva à peroxidação lipídica, ocorrência de alterações do tipo apoptótica e oxidação do DNA (FRASER; STRZEŻEK *et al.*, 2014; TRZCIŃSKA; BRYŁA *et al.*, 2015) decorrente de eles possuírem alto teor de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática e número reduzido de mecanismos antioxidantes (ROS) (SOARES; BRITO *et al.*, 2021). Ainda apresentar uma menor relação de colesterol/fosfolipídios (YESTE; RODRÍGUEZ-GIL *et al.*, 2017) e a incorporação de fosfolipídios na membrana plasmática pelo lipossoma, pode torna-o com uma

a membrana mais resistente aos danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS).

Outra maneira para ajudar nos danos provocados pelo ROS é a adição de antioxidantes ao diluente, já que os espermatozoides de suínos possuem menos antioxidantes, quando comparado ao sêmen de bovinos (LEE; KIM, 2018). Essa adição de antioxidantes pode diminuir a formação de ROS e neutralizar seus efeitos protegendo a membrana plasmática da peroxidação lipídica (LEE; KIM, 2018). Diversos antioxidantes estão sendo estudados como ácido rosmarínico (FENG; LV *et al.*, 2020), e uso de diferentes carotenoides tem demonstrado efeitos antioxidantes com eficiente manutenção da viabilidade espermática após a criopreservação em suínos (LEE; KIM, 2018). Os carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis produzidos em plantas, bactérias e fungos que possuem propriedades antioxidantes utilizadas nas industriais alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (KIRTI; AMITA *et al.*, 2014; TIZKAR; KAZEMI *et al.*, 2015). Dentro dos carotenoides, temos o β -caroteno um membro importante da família dos carotenoides encontrados em muitas frutas e vegetais (MICHELON; MANTOVANI; *et al.*, 2016). O β -caroteno tem atividade biológica importante devido à atividade da provitamina A que resulta em benefícios potenciais à saúde, como fortalecimento do sistema imunológico e diminuição dos riscos de doenças degenerativas (MICHELON; DE MATOS DE BORBA *et al.*, 2012). Além disso ele possui um grande potencial como antioxidante quando incorporados aos lipossomas (MICHELON; MANTOVANI; *et al.*, 2016).

No entanto, existe uma grande divergência no quesito de fabricação dos lipossomas, como metodologias empregadas para sua fabricação, as quais podem ser usados solventes orgânicos como etanol (MICHELON; *et al.*, 2016), pela ruptura das membranas plasmáticas via sonicação (STREMERSCHE; VANDENBROUCKE *et al.*, 2016). Ainda tem a questão dos lipídios utilizados para fabricá-lo, os quais gera inúmeras possibilidades, nessa conjuntura alguns trabalhos utilizam fosfolipídios comerciais e lipídios extraídos da membrana da cabeça do espermatozoide (HE; BAILEY *et al.*, 2001), fosfolipídios comerciais puros como 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC; 18:1) entre outros (RÖPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011), fosfolipídios produzidos a partir do leite de soja (EL-KERABY; OSMAN *et al.*, 2010) e até mesmo a fosfatidilcolina obtida da gema de ovo (RÖPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011).

Mas a crescente preocupação com a questão da utilização de produtos livres de contaminação, surge a necessidade de substituição por produtos de origem vegetal (QURESHI; REHMAN *et al.*, 2014) Além disso, quando se utiliza a gema de ovo existe uma gama de variabilidade na composição da gema, risco de transmissão de doenças e contaminação bacteriana (ANZAR; RAJAPAKSHA *et al.*, 2019a). Por essas questões que atualmente está sendo utilizado fosfolipídios obtidos da lecitina de soja por apresentar um baixo custo de produção e padronização (MEDINA-LEÓN; DOMÍNGUEZ-MANCERA *et al.*, 2019) Outro ponto, é o custo de fabricação dos lipossomas, os fosfolipídios naturais purificados custam por volta de € 980 (Euros) (\pm R\$5.500) um valor extremamente alto, e a alternativa é a utilização dos não purificados, com custo de 10% desse valor do puro (YOKOTA; MORAES *et al.*, 2012). Na questão do processo de fabricação dos lipossomas, no qual dependendo da metodologia empregada pode ser oneroso os custos da fabricação, sendo que normalmente se utiliza solventes orgânicos para sua fabricação (GONNET; LETHUAUT *et al.*, 2010). Dentro dessas técnicas com uso de solvente orgânico, temos a técnica de injeção de etanol, o qual é um solvente orgânico farmacológico e de processamento de alimentos é bem aceito (MICHELON; MANTOVANI; *et al.*, 2016). No entanto, é indispensável que ao utilizar lipossomas a base desses solventes orgânicos junto aos espermatozoides ocorra um processo de evaporação desse solvente para que não ocorra a morte dos espermatozoides.

Considerações finais

Nota-se que a utilização de lipossomas no processo de criopreservação de sêmen, é uma alternativa para evitar/reparar os danos que ocorrem aos espermatozoides durante esse processo. No entanto, devemos ter cautela em sua aplicabilidade, tendo em vista as diferenças ocorrerem entre os diversos estudos apresentados, que vão desde dos fosfolipídios utilizados para a fabricação e/ou até mesmo a metodologia usada na fabricação.

Agradecimentos:

Este trabalho foi realizado durante bolsa financiada pela CAPES – Agência Federal de Apoio e Avaliação da Pós-Graduação do Ministério da Educação do Brasil do primeiro autor.

Referências

- ALMLID, T.; STAVNE, S. E.; JOHNSON, L. Fertility evaluation of the straw freezing technique for boar semen under practical artificial insemination conditions. **Reproduction in Domestic Animals**, 22, p. 193-202, 10/09 2007.
- ALONSO, C. N.; CASTAÑEIRA, C.; BRAGULAT, A. F.; LOSINNO, L. Effect of egg yolk-based extender and seminal plasma removal on sperm viability of cooled donkey semen. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 58, p. e174301, 2021.
- ANTIMISIARIS, S. G.; MOURTAS, S.; MARAZIOTI, A. Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery. **Pharmaceutics**, 10, n. 4, Nov 6 2018.
- ANZAR, M.; RAJAPAKSHA, K.; BOSWALL, L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. **PLOS ONE**, 14, n. 10, p. e0223977, 2019a.
- ANZAR, M.; RAJAPAKSHA, K.; BOSWALL, L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. **PloS one**, 14, n. 10, p. e0223977-e0223977, 2019b.
- BALBINO, T. A.; AOKI, N. T.; GASPERINI, A. A. M.; OLIVEIRA, C. L. P. *et al.* Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, 226, p. 423-433, 2013.
- BIANCHI, I. B. I.; MADEIRA, E. M.; SCHNEIDER, A.; RABASSA, V. R. *et al.* Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, 39, 2011.
- BUSTANI, G. S.; BAIEE, F. H. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. **Veterinary World**, p. 1220-1233, 2021.
- CASAS, I.; ALTHOUSE, G. C. The protective effect of a 17 degrees C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 degrees C. **Cryobiology**, 66, n. 1, p. 69-75, Feb 2013.

- EL-KERABY, F.; OSMAN, K.; GANAH, H.; EL-SIEFY, E. SOYMILK-BASED EXTENDER FOR CRYOPRESERVATION OF BOVINE SEMEN. **Journal of Animal and Poultry Production**, 1, n. 2, p. 61-69, 2010.
- ERIKSSON, B. M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J. *et al.* Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. **Theriogenology**, 55, n. 8, p. 1593-1605, May 1 2001.
- FENG, T.-Y.; LV, D.-L.; ZHANG, X.; DU, Y.-Q. *et al.* Rosmarinic acid improves boar sperm quality, antioxidant capacity and energy metabolism at 17°C via AMPK activation. **Reproduction in Domestic Animals**, 55, n. 12, p. 1714-1724, 2020.
- FRASER, L.; STRZEŻEK, J.; KORDAN, W. Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. **Anim Reprod Sci**, 147, n. 3-4, p. 119-127, Jun 30 2014.
- GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, 146, n. 3, p. 276-290, 2010/09/15/ 2010.
- GOODE, P.; ELLSE, L.; WALL, R. Preventing tick attachment to dogs using essential oils. **Ticks Tick Borne Dis**, 9, n. 4, p. 921-926, May 2018.
- GUPTA, S.; FINELLI, R.; AGARWAL, A.; HENKEL, R. Total antioxidant capacity- Relevance, methods and clinical implications. **Andrologia**, 53, n. 2, p. e13624, Mar 2021.
- HE, L.; BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential1. **Biology of Reproduction**, 64, n. 1, p. 69-79, 2001.
- HERMANSSON, U.; JOHANNISSON, A.; AXNER, E. Cryopreservation of dog semen in a Tris extender with two different 1% soybean preparations compared with a Tris egg yolk extender. **Vet Med Sci**, Feb 11 2021.
- HERMANSSON, U.; JOHANNISSON, A.; AXNER, E. Cryopreservation of dog semen in a Tris extender with two different 1% soybean preparations compared with a Tris egg yolk extender. **Veterinary medicine and science**, 7, n. 3, p. 812-819, 2021.
- JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. Storage of boar semen. **Anim Reprod Sci**, 62, n. 1-3, p. 143-172, Aug 18 2000.
- JUDDE, A.; VILLENEUVE, P.; ROSSIGNOL-CASTERA, A.; LE GUILLOU, A. Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 80, n. 12, p. 1209-1215, 2003/12/01 2003.
- KIRTI, K.; AMITA, S.; PRITI, S.; MUKESH KUMAR, A. *et al.* Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. **Advances in Biology**, 2014, p. 1-13, 2014.

KNOX, R. The Fertility of Frozen Boar Sperm When used for Artificial Insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, 50, n. S2, p. 90-97, 2015.

KUMAR, P.; SAINI, M.; KUMAR, D.; BALHARA, A. K. *et al.* Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Animal Reproduction Science**, 159, p. 38-45, 2015/08/01/ 2015.

LAYEK, S. S.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean-based extenders. **Anim Reprod Sci**, 172, p. 1-9, Sep 2016.

LEE, E.; KIM, D. Effects of Astaxanthin on Miniature Pig Sperm Cryopreservation. **BioMed Research International**, 2018, p. 1-9, 2018.

LONG, J.; CONN, T. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 C for 24 hours. **Poultry science**, 91, n. 8, p. 1990-1996, 2012.

LUNA-OROZCO, J. R.; GONZÁLEZ-RAMOS, M. A.; CALDERÓN-LEYVA, G.; GAYTÁN-ALEMÁN, L. R. *et al.* Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. **Iran J Vet Res**, 20, n. 2, p. 126-130, Spring 2019.

MAFOLO, K. S.; PILANE, C. M.; CHITURA, T.; NEDAMBALE, T. L. Use of phosphatidylcholine in Tris-based extender with or without egg yolk to freeze Bapedi ram semen. **South African Journal of Animal Science**, 50, n. 3, p. 389-396, 2020.

MEDINA-LEÓN, A. Z.; DOMÍNGUEZ-MANCERA, B.; CAZALEZ-PENINO, N.; CERVANTES-ACOSTA, P. *et al.* Cryopreservation of horse semen with a liposome and trehalose added extender. **Austral journal of veterinary sciences**, 51, p. 119-123, 2019.

MEHDIPOUR, M.; DAGHIGH KIA, H.; NAZARI, M.; NAJAFI, A. Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. **Cryobiology**, 78, p. 34-40, Oct 2017.

MICHELON, M.; DE MATOS DE BORBA, T.; DA SILVA RAFAEL, R.; BURKERT, C. A. V. *et al.* Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. **Food Science and Biotechnology**, 21, n. 1, p. 1-8, 2012/02/01 2012.

MICHELON, M.; MANTOVANI, R. A.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; DE LA TORRE, L. G. *et al.* Structural characterization of β -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. **Food Research International**, 79, p. 95-105, 2016.

MIGUEL-JIMENEZ, S.; RIVERA DEL ALAMO, M. M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; HIDALGO, C. O. *et al.* In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. **Anim Reprod Sci**, 215, p. 106315, Apr 2020.

MONTEIRO, M. S.; TORRES, M. A.; PASSARELLI, M. d. S.; MARTINS, M. P. *et al.* Impact of cryopreservation protocols (one- and two-step) on boar semen quality at 5 °C and post-thawing. **Animal Reproduction Science**, 247, p. 107093, 2022/12/01/ 2022.

MORAES, M.; CARVALHO, J. M. P.; SILVA, C. R.; CHO, S. *et al.* Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. **International Journal of Food Science & Technology**, 48, n. 2, p. 274-282, 2013.

MORTAZAVI, S.-H.; ESLAMI, M.; FARROKHI-ARDABILI, F. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. **Animal Reproduction Science**, 219, p. 106533, 2020/08/01/ 2020.

MORTAZAVI, S. H.; ESLAMI, M.; FARROKHI-ARDABILI, F. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. **Anim Reprod Sci**, 219, p. 106533, Aug 2020.

NAJAFI, A.; KIA, H. D.; MEHDIPOUR, M.; HAMISHEHKAR, H. *et al.* Effect of quercetin loaded liposomes or nanostructured lipid carrier (NLC) on post-thawed sperm quality and fertility of rooster sperm. 152, p. 122-128, 2020.

NAJAFI, A.; TAHERI, R. A.; MEHDIPOUR, M.; FARNOOSH, G. *et al.* Lycopene-loaded nanoliposomes improve the performance of a modified Beltsville extender broiler breeder roosters. **Anim Reprod Sci**, 195, p. 168-175, Aug 2018.

OKE, M.; JACOB, J.; PALIYATH, G. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. **Food Research International**, 43, p. 232-240, 01/31 2010.

OLDENHOF, H.; FRIEDEL, K.; SIEME, H.; GLASMACHER, B. *et al.* Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, 61, n. 1, p. 115-122, 2010/08// 2010.

PASCHOAL, A. F. L.; LUTHER, A. M.; JAKEL, H.; SCHEINPFLUG, K. *et al.* Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5 degrees C. **PLoS One**, 15, n. 6, p. e0234339, 2020.

PEZO, F.; YESTE, M.; ZAMBRANO, F.; URIBE, P. *et al.* Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm. **Cryobiology**, 98, p. 5-11, Feb 2021.

PILLET, E.; LABBE, C.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G. *et al.* Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology**, 77, n. 2, p. 268-279, Jan 15 2012.

PILLET, E.; LABBE, C.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G. *et al.* Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology**, 77, n. 2, p. 268-279, 2012/01/15/ 2012.

QURESHI, M.; REHMAN, F.; KHAN, R. Effect of Soybean Based Extenders on Sperm Parameters of Holstein- Friesian Bull During Liquid Storage at 4°C. **Pakistan journal of zoology**, 46, p. 185-189, 02/01 2014.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ESTRADA, E. Artificial Insemination in Boar Reproduction. *In*: BONET, S.; CASAS, I., *et al* (Ed.). **Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 589-607.

ROPKE, T.; OLDENHOF, H.; LEIDING, C.; SIEME, H. *et al*. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. **Theriogenology**, 76, n. 8, p. 1465-1472, Nov 2011.

RÖPKE, T.; OLDENHOF, H.; LEIDING, C.; SIEME, H. *et al*. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. **Theriogenology**, 76, n. 8, p. 1465-1472, 2011/11/01/ 2011.

SAAEELDIN, I. M.; KHALIL, W. A.; ALHARBI, M. G.; LEE, S. H. The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. **Animals: an open access journal from MDPI**, 10, n. 12, 12/03/2020 2020a.

SAAEELDIN, I. M.; KHALIL, W. A.; ALHARBI, M. G.; LEE, S. H. The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. **Animals (Basel)**, 10, n. 12, Dec 3 2020b.

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; CALVETE, J. J. *et al*. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. **Theriogenology**, 71, n. 4, p. 662-675, Mar 1 2009.

SHEN, T.; JIANG, Z. L.; LI, C. J.; HU, X. C. *et al*. Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing-thawing. **Zygote**, 24, n. 2, p. 259-265, Apr 2016.

SOARES, S. L.; BRITO, C. R. C.; ANCIUTI, A. N.; GATTI, N. C. *et al*. Nanocarried antioxidants in freezing extenders for boar spermatozoa. **Andrologia**, 53, n. 10, p. e14199, Nov 2021.

STREMERSCHE, S.; VANDENBROUCKE, R. E.; VAN WONTERGHEM, E.; HENDRIX, A. *et al*. Comparing exosome-like vesicles with liposomes for the functional cellular delivery of small RNAs. **J Control Release**, 232, p. 51-61, Jun 28 2016.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. **Reproduction**, 146, n. 1, p. R21-35, Jul 2013.

TAOUZINET, L.; FATMI, S.; LAHIANI-SKIBA, M.; SKIBA, M. *et al*. Encapsulation Nanotechnology in Sperm Cryopreservation: Systems Preparation Methods and Antioxidants Enhanced Delivery. **Cryo Letters**, 42, n. 1, p. 1-12, Jan-Feb 2021.

TIZKAR, B.; KAZEMI, R.; ALIPOUR, A.; SEIDAVI, A. *et al*. Effects of dietary supplementation with astaxanthin and β -carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*). **Theriogenology**, 84, n. 7, p. 1111-1117, 2015/10/15/ 2015.

TOMÁS, C.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; DE MERCADO, E. Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, 144, n. 3, p. 115-121, 2014/01/30/ 2014.

TORRES, M. A.; PEDROSA, A. C.; NOVAIS, F. J.; ALKMIN, D. V. *et al.* Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability†. **Biology of Reproduction**, 106, n. 1, p. 213-226, 2021.
TRZCIŃSKA, M.; BRYŁA, M.; GAJDA, B.; GOGOL, P. Fertility of boar semen cryopreserved in extender supplemented with butylated hydroxytoluene. **Theriogenology**, 83, n. 3, p. 307-313, Feb 2015.

WABERSKI, D.; RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; WEITZE, K. F. *et al.* Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. **Theriogenology**, 137, p. 2-7, 2019/10/01/ 2019.

WM; A., J. L.; WEITZE, K. F.; FISER, P. *et al.* Storage of boar semen. **Animal reproduction science**, 62, n. 1-3, 08/18/2000 2000.

YESTE. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, 85, n. 1, 01/01/2016 2016.

YESTE, M. Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. **Reprod Domest Anim**, 50 Suppl 2, p. 71-79, Jul 2015.

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. **Animal Reproduction**, 14, n. 1, p. 69-81, 2017.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; RIVERA DEL ALAMO, M. M.; BONET, S. *et al.* The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17 degrees C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e90887, 2014.

YESTE, M.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. **Mol Reprod Dev**, 84, n. 9, p. 802-813, Sep 2017.

YESTE, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. **Molecular Reproduction and Development**, 84, n. 9, p. 802-813, 2017.

YOKOTA, D.; MORAES, M.; PINHO, S. C. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: a case study of casein hydrolysate microencapsulation. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, 29, p. 325–335., 2012.

2.3 Artigo 3

CITOTOXICIDADE DO LIPOSSOMA DE FOSFATIDILCOLINA NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SUINOS

Cléderson Idênio Schmitt
Antonio Sergio Varela Junior
Fernanda Dagmar Martins Krug
Andreia Nobre Anciuti
Izani Bonel Acosta
Mariano Michelin
Cristiana Lima Dora
Rodrigo Dessesards Jardim
Carine Dahl Corcini

Submetido à revista Revista Animal Reproduction Science

CITOTOXICIDADE DO LIPOSSOMA DE FOSFATIDILCOLINA NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN SUINOS

RESUMO:

O processo de criopreservação do sêmen suíno ainda é um grande desafio para pesquisadores que tentam encontrar um crioprotetor que mantenha a célula viável após o congelamento, pois facilitaria seu uso cientificamente e comercialmente por longos períodos. Diante disso pesquisas são desenvolvidas para reduzir os danos causados pela criopreservação ao sêmen, entre elas a utilização dos lipossomas, que são vesículas coloidais com compartimento interno aquoso que atuam como estabilizante de membrana, pela incorporação de lipídios exógenos na membrana dos espermatozoides. Neste estudo buscou-se avaliar a citotoxicidade de um lipossoma comercial denominado de S100 em células espermáticas de suínos, utilizando as células espermáticas de dez machos diferentes (~ 80mL com ~2,6 bilhões de espermatozoides, cada dose). Os lipossomas testados foram fabricados pelo processo de injeção de etanol, com 98% de fosfatidilcolina comercial Lipoid GmbH (Alemanha), sendo acrescentados ao diluente plasma lactose. Foram testadas quatro diluições a 5°C e a 17°C de resfriamento por até quatro dias. Avaliou-se a cinética espermática, pelo sistema automatizado CASA. Os parâmetros avaliados foram: MT, MP, VCL, VSL, VAP, STR, LIN, WOB, BCF, ALH, DCL, DSL, DAP. Os resultados mostraram que esse lipossoma apresenta uma alta citotoxicidade em todas as concentrações quando a 5°C já no primeiro dia. No 17°C, a concentração de 1nmol não provocou um efeito tóxico no primeiro dia, mantendo vivo os espermatozoides, mas com uma qualidade cinética inferior aos espermatozoides armazenados sem lipossomas. Já a partir do segundo dia, todas as concentrações foram citotóxicas. Os resultados demonstram que a utilização do lipossoma (S100) a 5°C em todas as concentrações, bem como nas concentrações mais altas a 17°C pode ser considerado altamente tóxico as células espermáticas de suínos.

Palavras-chave: suíno, lipossoma, fosfolipídios, criopreservação

INTRODUÇÃO

Atualmente se busca novos agentes crioprotetores no processo de preservação seminal do sêmen suíno, já que o processo de congelamento – descongelamento afeta as células espermáticas, tendo uma capacidade de fertilização muito menor quando comparado ao sêmen resfriado (KNOX, 2015). Com isso, alguns estudos buscam meios para reduzir os danos aos espermatozoides, utilizando alguns crioprotetores como gema de ovo, que atua como um crioprotetor seminal em diversas espécies (ALONSO; CASTAÑEIRA et al., 2021; YESTE, 2017)).

Na alternativa da gema de ovo, estudos vem buscado estudar as aplicações de nanomateriais na reprodução, através da entrega direcionada de substâncias a uma célula como:

antioxidantes, antimicrobianos (SAADELDIN; KHALIL et al., 2020). Dentro das estratégias utilizando nanomateriais, está a utilização de lipossomas para evitar ou reparar os danos que ocorrem nos espermatozoides durante a criopreservação (BENCHARIF; DORDAS-PERPINYA, 2020), estes lipossomas são vesículas coloidais compostas de lipídeos anfipáticos com compartimento interno aquoso (BALBINO; AOKI et al., 2013; TAOUZINET; FATMI et al., 2021)

Possui grande potencial para aplicações devido à sua biocompatibilidade, potencial de liberação sustentada, capacidade de atuar como veículo para compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (MORAES; CARVALHO *et al.*, 2013). Também facilitam a transferência de lipídios e colesterol, levando ao rearranjo dos componentes da membrana celular, modificando as propriedades físico-químicas da membrana, resultando na melhoria da criotolerância dos espermatozoides (ROPKE; OLDENHOF et al., 2011; SULLIVAN; SAEZ, 2013)).

Diante dessas vantagens e do crescente interesse na utilização de lipossomas, objetivou-se avaliar a citotoxicidade de um lipossoma comercial denominado de S100, composto com 98% de fosfatidilcolina em células espermáticas de suínos.

Materiais e Métodos

O presente trabalho foi submetido ao comitê de ética e experimentação animal da UFPel, sendo dispensado de registro segundo a lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008). O conteúdo seminal utilizado neste trabalho é oriundo de uma central comercial de reprodutores de suínos.

Produção de diluente

O diluente de resfriamento utilizado foi preparado em duas etapas. A primeira etapa de acordo com a metodologia proposta por BRITO; VARELA JUNIOR *et al.* (2021), resumidamente utilizou-se gemas de ovos e solução lactose na concentração de 11%. Em

seguida, na segunda etapa, o diluente preparado na etapa anterior, foi centrifugado para extrair a fração do plasma da gema conforme metodologia proposta por (AMIRAT; TAINQUIER et al. (2004)), onde se centrifugou o diluente obtido na etapa anterior por três vezes a $\times 10.000$ g de rotação, por 45min a 5°C, de cada vez, sempre recuperando o sobrenadante e descartando o pellet (Eppendorf Centrifuge 5804R, Alemanha) (AMIRAT; TAINQUIER et al., 2004).

Produção do lipossoma

Os lipossomas foram produzidos pelo laboratório de Microbiologia e Biosseparações da Universidade Federal de Rio Grande, conforme metodologia descrita em MICHELON;; MANTOVANI; *et al.* (2016). Utilizou-se o processo de injeção de etanol, com composição com 98% m/m fosfatidilcolina comercial da Lipoid GmbH (Alemanha), sendo identificado comercialmente como S100 (Tabela 1).

Tabela 1. Caracterização diâmetro médio (Dh), índice de polidispersividade (IPd), Potencial- ζ e pH do lipossoma

Lipossoma	Dh (nm)	IPd (%)	Potencial- ζ (mV)	pH
S100	281,9 \pm 19,0	0,146 \pm 0,06	-9,51 \pm 1,83	5,36

Para o uso do lipossoma, uma dispersão de 100mL contendo 10mM (7,8 mg/mL) do S100, foi acrescido nos componentes da fórmula do diluente BTS para um volume de 100ml. Após, realizou-se a retirada residual de etanol esse composto (lipossoma + diluente) foi aquecido a 40°C em homogeneizador trans orbital até perda de 10% do volume inicial da solução, realizando ao final do processo a adição de água esterilizada deionizada (Aquatec®, Caithec, Brasil), para solução final de 100mL.

Doses de sêmen

Neste experimento, utilizou-se doses de sêmen de 10 machos diferentes (n = 10), da mesma linhagem, mantidos em baias individuais e recebendo a mesma ração. As doses foram

compostas por ~ 80mL de uma fração do ejaculado (~2,6 bilhões de espermatozoides) diluídos em diluente comercial (Androstar®, Minitub, Alemanha).

Após a chegada no laboratório, foram mantidas por 90 min a 17°C. Em seguida, as doses foram homogeneizadas e 13,3mL foram distribuídos em cinco tubos de 15mL de capacidade e centrifugados a 800g, por 10min (centrífuga Baby FANEM, São Paulo, Brasil) (CHANAPIWAT; KAEOKET *et al.*, 2012). O sobrenadante foi descartado e o pellet formado em cada tubo, contendo aproximadamente 500 milhões de espermatozoides, foi ressuspenso em 334µL do diluente plasma-lactose-gema.

Tratamentos

Foram utilizadas cinco concentrações de lipossomas (Tabela 2), com 10 repetições cada e quatro avaliações ao longo do tempo.

Tabela 2. Tratamentos e concentrações do lipossoma

Tratamento	Concentração Inicial	Sol. LIPO 10mM (ml)	Gema Lactose (mL)	Plasma de gema _ lactose - PL (ml)	Concentração final
4nmol	5nM	0,5	0	-	2,5
3nmol	3,75nM	0,375	0,125	0,5	1,875
2nmol	2,5nM	0,25	0,25	0,5	1,25
1nmol	1,25nM	0,125	0,375	0,5	0,625
0nmol	0nM	-	-	1	0

O processo de diluição do tratamento junto ao sêmen se deu inicialmente a distribuição do sêmen em tubos de 0,5ml, sendo adicionado 90µL, e após adicionou-se 90µL do tratamento. Após, os tubos com os tratamentos + sêmen (já diluído) foram mantidos a temperatura de 17°C, na caixa refrigerada da Minitube (Minitube, Alemanha) por duas horas para ocorrer estabilização da temperatura do sêmen e a incorporação dos lipossomas. Após esse período as doses que foram armazenadas a 17°C ficaram na caixa refrigerada de 17°C, e as doses de 5°C foram alocadas em uma bandeja plástica imersos em 1,5L de água e armazenadas na caixa refrigerada da Minitube (Minitube, Alemanha) de 5°C para realização da curva de resfriamento

com o objetivo de reduzir a temperatura até atingir os 5°C. Depois de atingirem a temperatura, as doses foram realocadas em suportes para tubos de 1,5mL e mantidas a 5°C por 24h.

Para avaliação da cinética espermática dos tratamentos nos tempos de 2h, 24h 48h, 72h, de armazenamento. Por questões de análises de estatísticas, o tempo foi considerado como dia 1 (2h), dia 2 (24h), dia 3 (48h) e dia 4 (72h). Em cada uma das análises foi retirado uma alíquota de 3µL de cada tratamento e diluída em 18µL de Albumina de Soro Bovino (BSA) diluída em Solução de Beltsville (BTS) (3mg BSA/100mL BTS), após foi deixado incubando a 38°C em placa aquecida por 10min. Posteriormente, 3µL de cada amostra obtida na etapa anterior foram carregados em uma lâmina e lamínula aquecidas para leitura no sistema automatizado computer assisted sperm analysis (Sperm Vision® 3.5, Minitub, Tiefenbach, Germany). Os parâmetros avaliados neste estudo foram: motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP); velocidade curvilínea (VCL); velocidade linear progressiva (VSL); velocidade média da trajetória (VAP); Retilinearidade (STR); lineariedade (LIN); coeficiente de oscilação (WOB); frequência de batimento flagelar cruzado (BCF); amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH); distância curvilínea (DCL); distância linear progressiva (DSL); e distância média da trajetória (DAP).

A análise estatística foi realizada no software Statistix 10TM. Sendo utilizado o Teste U de Mann-Whitney, e as médias foram comparados por meio de Análise de Variância, e Tukey, com intervalo de confiança de 95%.

Resultados e Discussões

As doses armazenadas a 5°C foram analisadas somente no primeiro dia, onde todos os grupos que possuíam os lipossomas foram citotóxico em todas as concentrações, ocasionando a morte dos espermatozoides, com isso não se realizou mais as análises das amostras a 5°C. Nas doses armazenadas a 17°C, observou-se alta citotoxicidade nas concentrações 2nmol a 5nmol, ocasionando a morte de todos os espermatozoides. Já na concentração de 1nmol, a morte das

células espermáticas ocorreu a partir do segundo dia de análise (Tabela 3). Resultados semelhantes foram observados por (SILVA; LEÃO *et al.*, 2021) que ao adicionarem melatonina em diluentes para criopreservação de sêmen ocasionou a morte de todos os espermatozoides.

Tabela 3. Resultados da Cinética espermática a 17°C usando 1nmol de Lipossoma

Análise	SEM LIPOSSOMA	1nmol de lipossoma
MOTTOTAL	65,57 ± 1,19 ^A	10,05 ± 0,70 ^B
MOTPROGR	34,68 ± 1,24 ^A	6,86 ± 0,61 ^B
DAP	37,68 ± 6,16 ^A	13,82 ± 1,06 ^B
DCL	44,27 ± 1,40 ^A	20,45 ± 1,23 ^B
DSL	28,80 ± 2,35 ^A	11,06 ± 1,05 ^B
VAP	45,63 ± 1,79 ^A	33,33 ± 2,51 ^B
VCL	96,76 ± 3,03 ^A	49,62 ± 3,09 ^B
VSL	62,95 ± 5,08 ^A	27,35 ± 2,66 ^B
STR	7,68 ± 1,36 ^A	0,77 ± 0,016 ^B
LIN	0,41 ± 0,015 ^A	0,55 ± 0,021 ^B
WOB	0,46 ± 0,015 ^A	0,68 ± 0,018 ^B
ALH	2,74 ± 0,13 ^A	2,22 ± 0,11 ^B
BCF	26,29 ± 1,12 ^A	26,2 ± 1,44 ^B

As médias seguidas da mesma letra em cada coluna não diferiram, comparando-se a média dos parâmetros analisados nas concentrações do lipossoma, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

A toxicidade observada de uma forma geral, seja decorrente do processo de fabricação dos lipossomas, por injeção de etanol a 10%. Desse modo, no preparo dos diluentes com lipossomas foi necessário extrair o etanol presente através de aquecimento e perda de 10% do volume do diluente com lipossoma. No entanto, esse processo utilizado pode ter ficado com algum resquício de etanol e pode ter provocado essa citotoxicidade, pois alguns estudos apontam que a utilização de etanol no processo de obtenção de melatonina na concentração de 2% ocasionou a morte de todos os espermatozoides (SILVA; ABEBE *et al.*, 2003). Já usando uma concentração de 0,01% de etanol no processo de obtenção da melatonina, não teve

citotoxicidade (PANG; SUN *et al.*, 2016) Ou seja, na nossa pesquisa utilizou-se lipossomas fabricados com 10% de etanol, uma alta concentração, o que pode ter levado a citotoxicidade, principalmente nas concentrações de 2,5nM a 5nM. Na concentração de 1,25nM não tenha ocorrido de imediato por causa da diluição realizada, obtendo a concentração final de 0,625nM. No entanto, com 24h de armazenamento, já ocorreu um efeito deletério provocando a morte de todas as células espermáticas que estavam com lipossomas incubando.

No entanto, os resultados obtidos demonstraram que a concentração desse lipossoma é extremamente prejudicial aos espermatozoides de suínos, ocasionando resultados extremamente inferiores quando comparados aos espermatozoides que foram armazenados sem a adição de lipossomas. Quando analisamos os parâmetros de cinética espermática, realizando o comparativo entre os resultados das doses armazenadas com lipossomas versus doses sem lipossomas, observamos uma redução média de 19,27% dos parâmetros da cinética espermática, mostrando que esse lipossoma se tornou citotóxico às células espermáticas. Já nos parâmetros de motilidade, como motilidade total e a progressiva, ocorreu uma redução de 55,52% na motilidade total e 27,81% na motilidade progressiva ao comparar as doses armazenadas sem os lipossomas e as com 1nmol de lipossoma.

Em quase todos os parâmetros da cinética espermática, as doses armazenadas sem a adição de lipossomas se mostraram com resultados superiores em todos os parâmetros analisados. Dentre dos parâmetros suplementares, o coeficiente Woble ocorreu incremento de 0,23% e na linearidade com incremento de 0,14%, em relação ao grupo sem a adição de lipossoma. No caso da motilidade total, obteve-se 65,57% sem a adição de lipossomas e 10,05% com adição de 1nmol de lipossomas, situação semelhante ocorre na motilidade progressiva onde obteve-se 34,68% sem os lipossomas e 6,87% com 1nmol de lipossomas, mostrando uma grande diferença entre as doses com lipossomas e as sem lipossomas.

Trabalhos utilizando lipossomas no processo de criopreservação do sêmen suíno, mostram resultados considerados satisfatórios, quando utilizado a vitamina E junto ao lipossoma. Pesquisa feita por MERKIES; BEAN *et al.* (2003) mostra que os lipossomas a base de fosfatidilcolina se aderem ao espermatozoide e se fundem com a membrana plasmática, ocorrendo uma melhora nos parâmetros espermáticos pela fusão da membrana, já que os lipídios são um componente básico do sêmen e contribuem para o funcionamento da membrana, para o metabolismo dos espermatozoides e aumentam a sua competência para capacitar e fertilizar o gameta feminino (HÖFNER; LUTHER *et al.*, 2020). Entretanto outros estudos mostram que a fosfatidilcolina não melhora os parâmetros de cinética espermática de espermatozoides suínos no processo de criopreservação (ALVAREZ-RODRIGUEZ; VICENTE-CARRILLO *et al.*, 2017; PARKS; LYNCH, 1992), assim como em que não observamos a melhora dos parâmetros da cinética espermática quando comparado ao grupo controle. Outro ponto, é a formulação desse lipossoma contendo 98% de fosfatidilcolina, sendo considerada uma alta concentração quando comparamos a outros trabalhos que utilizaram fosfatidilcolina a base de lecitina de soja no processo de congelamento de espermatozoides. As concentrações mais utilizadas no processo de criopreservação do sêmen foram de 3% em humanos, 1-3% em cães, 1,5% em coelhos, 3,5% em carneiros, 2-5% no urso pardo, e apenas 0,2% em suínos avaliando o efeito da refrigeração do sêmen (ALVAREZ-RODRIGUEZ; VICENTE-CARRILLO *et al.*, 2017). Além dessa concentração alta de fosfatidilcolina no lipossoma, as nossas diluições finais obtidas de 2,5nmol; 1,875nmol; 1,25nmol tornaram-se altamente tóxica e 0,625nmol foi a que não ocasionou a morte dos espermatozoides no primeiro dia, mostrando que essas concentrações finais não são recomendadas no processo de refrigeração do sêmen de suínos.

Essa alta toxicidade foi observada principalmente nas doses que foram armazenadas a temperatura de 5°C, onde em todas as concentrações utilizadas ocasionou a morte dos

espermatozoides, já no primeiro dia de análise. Com isso descartou-se as análises a essa temperatura. Alguns trabalhos indicam que a alta concentração (1% p/p) de fosfatidilcolina apresenta um efeito antioxidante (JUDDE; VILLENEUVE *et al.*, 2003). Além disso, resultados com uso de lipossomas de lecitina de soja a partir de 1% até 10% de concentração de lecitina, proporcionam efeitos antioxidantes (NASAB; TAKZAREE *et al.*, 2019). No entanto, não observamos esse efeito e sim efeito deletério principalmente nas altas concentrações iniciais utilizadas na nossa pesquisa (2,5nM, 3,75nM e 5,0nM) em ambas temperaturas de armazenamento. Porém, mesmo a concentração de 1,25nM nas doses armazenadas a 5°C ocorreu a morte dos espermatozoides já no primeiro dia, diferente do que ocorreu nas doses armazenadas a 17°C.

Estes resultados podem estar associados ao uso do lipossoma de forma associada ao diluente a base de plasma de gema de ovo com lactose a 20%. Sendo o diluente utilizado a base da gema de ovo, em média ele contém aproximadamente 1,35% de fosfatidilcolina (ALVAREZ-RODRIGUEZ; VICENTE-CARRILLO *et al.*, 2017) somado aos 98% de fosfatidilcolina dos lipossomas podem ter ocasionado esse efeito citotóxico as células espermáticas. Pois normalmente os extensores utilizados no processo de criopreservação de sêmen suíno a base de soja, possui em sua composição a lecitina de soja que contém 19-21% é fosfatidilcolina (ALVAREZ-RODRIGUEZ; VICENTE-CARRILLO *et al.*, 2017).

A morte dos espermatozoides também pode estar relacionada com a rediluição feita com as doses de sêmen, pois elas foram adquiridas com um diluente comercial e depois realizamos a centrifugação para retirada do mesmo e colocação do nosso diluente com os lipossomas. Este processo de diluição dos ejaculados de suínos pode ter reduzido a disponibilidade de proteínas plasmáticas seminais e outros constituintes que são essenciais para sustentar a conformação da membrana celular (BOE-HANSEN; CHRISTENSEN *et al.*, 2008) Além de poder afetar o funcionamento de vários compartimentos intracelulares, levando a

alterações na fluidez da membrana fosfolipídica, equilíbrio iônico e metabolismo e, conseqüentemente, na motilidade e longevidade espermática (SZYMANOWICZ; SCHWARZ *et al.*, 2019).

Conclusão

O uso de lipossoma comercial S100, produzido pelo método de injeção de etanol e tendo em sua composição 98% m/m fosfatidilcolina comercial da Lipoid GmbH (Alemanha), junto ao processo de refrigeração do sêmen suíno é extremamente tóxica. Principalmente nas doses armazenadas a 5°C, pois ocasionou a morte dos espermatozoides já na primeira análise em todas as concentrações.

Quando esses lipossomas foram adicionados nas doses armazenadas a 17°C não se obteve melhora nos parâmetros de cinética espermática, e sim uma piora desses parâmetros quando comparados ao grupo controle, apenas na concentração mais baixa, nas demais concentrações o efeito foi deletério. Diante dos resultados obtidos, é possível compreender que concentrações finais acima de 0,625nmol são extremamente tóxicas aos espermatozoides de suínos. E que são necessários mais estudos com esse lipossoma, principalmente buscando concentrações finais mais baixas.

Agradecimentos:

Agradecemos a Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSUR) por ter fornecido as doses de sêmen. Este trabalho foi realizado durante bolsa financiada pela CAPES – Agência Federal de Apoio e Avaliação da Pós-Graduação do Ministério da Educação do Brasil do primeiro autor (308152/2019).

Referências:

ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; VICENTE-CARRILLO, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Exogenous Individual LecithinPhospholipids (Phosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol) Cannot Prevent the Oxidative Stress Imposed by Cryopreservation of Boar Sperm. **Journal of Veterinary Medicine and Surgery**, 1, 2017.

BENCHARIF, D.; DORDAS-PERPINYA, M. Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last 20 years. **Reprod Domest Anim**, 55 Suppl 2, p. 61-65, Jul 2020.

BOE-HANSEN, G. B.; CHRISTENSEN, P.; VIBJERG, D.; NIELSEN, M. B.; HEDEBOE, A. M. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. **Theriogenology**, 69, n. 6, p. 728-736, Apr 1 2008.

BRASIL. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. (Brasília, 8 de outubro de 2008;). 2008.

BRITO, C. R. C.; VARELA JUNIOR, A. S.; GHELLER, S. M. M.; ACOSTA, I. B.; ANCIUTI, A. N.; GATTI, N. L. S.; SILVA, E. A.; KNABAH, N. W.; CORCINI, C. D. High-speed centrifugation of extender of freeze-thaw boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, 56, n. 5, p. 821-825, 2021.

CHANAPIWAT, P.; KAEOKET, K.; TUMMARUK, P. Cryopreservation of Boar Semen by Egg Yolk-Based Extenders Containing Lactose or Fructose is Better Than Sorbitol. **Journal of Veterinary Medical Science**, 74, n. 3, p. 351-354, 2012.

HÖFNER, L.; LUTHER, A.-M.; PALLADINI, A.; FRÖHLICH, T.; WABERSKI, D. Tolerance of Stored Boar Spermatozoa to Autologous Seminal Plasma: A Proteomic and Lipidomic Approach. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, n. 18, DOI: 10.3390/ijms21186474.

JUDDE, A.; VILLENEUVE, P.; ROSSIGNOL-CASTERA, A.; LE GUILLOU, A. Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 80, n. 12, p. 1209-1215, 2003/12/01 2003.

KNOX, R. The Fertility of Frozen Boar Sperm When used for Artificial Insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, 50, n. S2, p. 90-97, 2015.

MERKIES, K.; BEAN, L. D.; BOEHNKE, K.; BUHR, M. M. Effect of select lipids and vitamin E on motility and viability of liquid and cryopreserved boar spermatozoa. 83, n. 1, p. 81-88, 2003.

MICHELON, M.; MANTOVANI, R. A.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; TORRE, L. G. d. l.; CUNHA, R. L. Structural characterization of β -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. **Food Research International**, 79, p. 95-105, 2016.

MORAES, M.; CARVALHO, J. M. P.; SILVA, C. R.; CHO, S.; SOLA, M. R.; PINHO, S. C. Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method:

characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. **International Journal of Food Science & Technology**, 48, n. 2, p. 274-282, 2013.

NASAB, M. E.; TAKZAREE, N.; SAFFARI, P. M.; PARTOAZAR, A. In vitro antioxidant activity and in vivo wound-healing effect of lecithin liposomes: a comparative study. 8, n. 8, p. 633-643, 2019.

PANG, Y. W.; SUN, Y. Q.; JIANG, X. L.; HUANG, Z. Q.; ZHAO, S. J.; DU, W. H.; HAO, H. S.; ZHAO, X. M.; ZHU, H. B. Protective effects of melatonin on bovine sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. **Mol Reprod Dev**, 83, n. 11, p. 993-1002, Nov 2016.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. **Cryobiology**, 29, n. 2, p. 255-266, Apr 1992.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I.; MATOS, F. J. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of Eucalyptus. **J Ethnopharmacol**, 89, n. 2-3, p. 277-283, Dec 2003.

SILVA, N. C.; LEÃO, K. M.; PÁDUA, J. T.; MARQUES, T. C.; NETO, F. R. A.; DODE, M. A. N.; CUNHA, A. T. M. Effect of different cryopreservation extenders added with antioxidants on semen quality and in vitro embryo production efficiency in cattle. **An Acad Bras Cienc**, 93, n. 3, p. e20191229, 2021.

SZYMANOWICZ, J.; SCHWARZ, T.; MURAWSKI, M.; MAŁOPOLSKA, M.; OSZCZĘDA, Z.; TUZ, R.; NOWICKI, J.; BARTLEWSKI, P. M. Storage of boar semen at 16-18 °C in the long-term commercial extender prepared with deionized water or nanowater. **Anim Reprod**, 16, n. 4, p. 864-870, Nov 18 2019

3.4 Artigo 4

LIPOSSOMA NO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO NO PROCESSO DE HOLDING TIME

Cléderson Idênio Schmitt
Antonio Sergio Varela Junior
Fernanda Dagmar Martins Krug
Andreia Nobre Anciuti
Izani Bonel Acosta
Mariano Michelin
Cristiana Lima Dora
Rodrigo Dessesards Jardim
Carine Dahl Corcine

Será submetido à Revista Reproduction

LIPOSSOMA NO DILUENTE DE REFRIGERAÇÃO DE SÊMEN SUÍNO NO PROCESSO DE HOLDING TIME

RESUMO

O objetivo desse trabalho é avaliar a adição de lipossomas a base de lecitina de soja no processo *holding time* de sêmen de suínos, e ainda avaliar esse processo de *holding time* por até 72h de armazenamento a 17°C e a 5°C. Nesse experimento foi utilizado plasma-lactose-gema como diluente de refrigeração, e lipossomas com composição a base de lecitinas de soja desengorduradas com >45% m/m fosfatidilcolina, 10–18% m/m fosfatidiletanolamina, <4% m/m lisofosfatidilcolina e <3% m/m triacilgliceróis, sendo identificado comercialmente como S45. Utilizou 10 doses comerciais (~80mL com ~2,6 bilhões de espermatozoides) de sêmen de 10 machos diferentes (n=10), da mesma linhagem, mantidos em baias individuais e recebendo a mesma ração. Após o processo de retirado do diluente comercial, foi adicionado o diluente plasma-lactose-gema e lipossoma com cinco concentrações (0nM, 1,25nM, 2,5nM, 3,75nM e 5nM) e armazenadas as doses a 17°C e a 5°C por até 72h. A qualidade do esperma foi verificada pela cinética espermática, utilizando o sistema CASA no dia 1, dia 2, dia 3 e dia 4. Os resultados demonstraram que o armazenamento a 17°C com a adição de lipossomas proporcionou ganho médio de 4,33% na cinética espermática, e 16% de ganho médio na motilidade em relação as doses sem os lipossomas. Já as doses armazenadas a 5°C, com a adição de lipossomas permaneceram viáveis por 24h de armazenamento, proporcionando na concentração de 3,75nM ganho do percentual de 10 dos 13 parâmetros, com exceção: STR, LIN, WOB, ainda a 5°C a concentração de 2,5nM que foi melhor por ter proporcionado um ganho de 16,26% em relação ao primeiro dia, seguido pela concentração de 3,75nM. Em conclusão, a utilização do lipossoma S45 no processo *holding time*, proporcionou melhores resultados por um período máximo de 24h, tanto das doses armazenadas a 17°C e a 5°C.

Palavras-chave: lipossoma, fosfatidilcolina, *holding time*, espermatozoide, lecitina de soja

INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) contribui para o melhoramento genético, diminui barreiras geográficas e a disseminação de doenças (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020). Em suínos, a utilização da IA é amplamente difundida em mais de 90% dos países ocidentais (KNOX, 2015; RODRÍGUEZ-GIL; ESTRADA, 2013; YESTE, 2016) e no Brasil a proporção de acasalamento por I.A é 95%, percentual semelhante aos outros maiores produtores de suínos, como na União Europeia (WABERSKI; RIESENBECK *et al.*, 2019).

No entanto, a maioria das IA ocorre com utilizando sêmen diluído e acondicionado no estado líquido entre 15 e 18°C por um período até cinco dias (BIANCHI; MADEIRA *et al.*, 2011). E a criopreservação do sêmen na espécie suína, não ocorre em uma escala comercial, por ocorre diversos danos aos espermatozoides causados pelo frio (PASCHOAL; LUTHER *et al.*, 2020). Sendo uma preocupação constante, com isso estudos buscam reduzir os danos provocados pelo processo de criopreservação (YESTE; RODRÍGUEZ-GIL *et al.*, 2017).

O sêmen suíno não pode ser criopreservado imediatamente, ele precisa ser mantido a 17°C antes da criopreservação por um período de tempo. Mais ainda se as centrais de criopreservação ficam longe das propriedades que fornecem o sêmen, devendo permanecer por até 24h a 15°-17°C (TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014). Ainda ele pode ser usado para melhorar o sêmen suíno criopreservado, pois o tempo de espera permite uma interação prolongada entre espermatozoide e plasma seminal e seus componentes (TORRES; MONTEIRO *et al.*, 2019a)

Esse tempo de espera antes do congelamento, é denominado genericamente de *holding time*, facilitando a criopreservação do sêmen suíno e também aumentando a criotolerância dos espermatozoides (CASAS; ALTHOUSE, 2013b; ERIKSSON; VAZQUEZ *et al.*, 2001; GALE; GIL; MALO; GONZÁLEZ *et al.*, 2015; TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014; YESTE, MARC; ESTRADA, EFRÉN *et al.*, 2014). Além de aumentar a criotolerância dos espermatozoides, através da remodelação da membrana plasmática e ainda minimizando a sensibilidade ao resfriamento (CASAS; ALTHOUSE, 2013a; TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014; WASILEWSKA; FRASER, 2017). No entanto, não há consenso em relação ao tempo do processo *holding time*, pesquisas mostram que o tempo ideal é no mínimo de três horas até vinte e quatro horas (TORRES; MONTEIRO *et al.*, 2019a; YESTE, MARC; ESTRADA, EFRÉN *et al.*, 2014). Ademais, os estudos utilizaram o tempo máximo de 24h de armazenamento e o BTS como diluente (CASAS; ALTHOUSE, 2013a; ERIKSSON; VAZQUEZ *et al.*, 2001; GALE; GIL; MALO; GONZALEZ *et al.*, 2015; TOMÁS; GÓMEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2014; YESTE, M.; ESTRADA, E. *et al.*, 2014).

Além disso, podemos usar diluentes que possam promover uma melhor crioproteção aos espermatozoides, como o plasma-lactose-gema que proporciona uma melhora na motilidade quando comparado ao diluente só com a gema de ovo (BRITO; VARELA JUNIOR *et al.*, 2021). Outra medida para evitar os danos causados pelo processo de criopreservação é a utilização de nanotecnologias (SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020). Dentro dessas tecnologias, destaca-se os lipossomas (LIPO), vesículas coloidais compostas de lipídeos anfipáticos com compartimento interno aquoso (SUN; HE *et al.*, 2021). Entre suas funcionalidades, destaca-se a capacidade de evitar ou reparar os danos que ocorrem nos espermatozoides durante esse processo (BALBINO; AOKI *et al.*, 2013; TAOUZINET; FATMI *et al.*, 2021).

Eles foram usados como aditivos crioprotetores em várias espécies animais, incluindo equinos (MEDINA-LEÓN; DOMÍNGUEZ-MANCERA *et al.*, 2019; PILLET; LABBE *et al.*, 2012), búfalo (KUMAR; SAINI *et al.*, 2015), ovinos (LUNA-OROZCO; GONZÁLEZ-RAMOS *et al.*, 2019; MAFOLO; PILANE *et al.*, 2020; MORTAZAVI; ESLAMI *et al.*, 2020), suínos (HE; BAILEY *et al.*, 2001), e bovinos (RÖPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011). Ajudando ainda na transferência de lipídios e colesterol, levando ao rearranjo dos componentes da membrana celular, resultando na melhoria da criotolerância dos espermatozoides (ROPKE; OLDENHOF *et al.*, 2011; SULLIVAN; SAEZ, 2013).

Diante disso, faz-se necessário estudar a possibilidade de aumentar o *holding time*, além das 24h e a substituição do BTS por outro meio que proporcione uma melhor estabilidade nos parâmetros da cinética espermática. Conseqüentemente, surge a possibilidade, de se testar a adição de lipossomas junto ao diluente no processo *holding time*. Nesse contexto, o objetivo desse trabalho é avaliar a adição de lipossomas a base de lecitina de soja no processo *holding time* de sêmen de suínos. E ainda avaliar esse processo de *holding time* por até 72h de armazenamento a 17°C e a 5°C.

MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética e Experimentação Animal UFPel, sendo dispensado de registro, segundo a Lei lei no 11.794, de 8 de outubro de 2008 (BRASIL, 2008). Os pesquisadores não tiveram contato ou manipularam os animais para a realização da coleta de sêmen. Visto que o sêmen utilizado na pesquisa foi adquirido de uma central comercial de reprodutores de suínos sendo assim utilizado doses comerciais.

Produção de diluente

Etapa 1:

Todos os produtos químicos foram obtidos da Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, EUA), salvo indicação em contrário. O diluente de resfriamento foi preparado de acordo com a metodologia proposta por BRITO; VARELA JUNIOR *et al.* (2021). Resumidamente utilizou-se gemas de ovos e solução lactose na concentração de 11%.

Etapa 2:

O diluente obtido na etapa um, foi centrifugado para extrair a fração do plasma da gema conforme metodologia proposta por AMIRAT; TAINTURIER *et al.* (2004). Sendo centrifugado o diluente obtido na etapa um por três vezes a $\times 10.000$ g de rotação, por 45min a

5°C (Centrifuge DTR 16000/ IONLAB), de cada vez, sempre recuperando o sobrenadante e descartando o pellet (Eppendorf Centrifuge 5804R, Alemanha) (AMIRAT; TAINTURIER *et al.*, 2004).

Produção do lipossoma

A produção, caracterização e determinação do potencial- ζ do lipossoma foi realizado pelo laboratório de microbiologia e bisseparações da Universidade Federal de Rio Grande, seguindo a metodologia descrita em MICHELON;; MANTOVANI; *et al.* (2016). Resumidamente foi utilizado o processo de injeção de etanol. Sua composição foi a base de lecitinas de soja desengorduradas com >45% m/m fosfatidilcolina, 10–18% m/m fosfatidiletanolamina, <4% m/m lisofosfatidilcolina e <3% m/m triacilgliceróis, sendo identificado comercialmente como S45. Após esse processo, ocorreu a caracterização do lipossoma (Tabela 1), no qual o diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersidade e valores de potencial- ζ (potencial elétrico).

Tabela 1. Caracterização diâmetro médio (Dh), índice de polidispersividade (IPd), Potencial- ζ e pH do lipossoma

Lipossoma	Dh (nm)	IPd (%)	Potencial- ζ (mV)	pH
S45	150,3 \pm 19,7	0,302 \pm 0,02	-35,3 \pm 1,63	4,67

Para o uso, uma dispersão de 100mL contendo 10mM (7,8 mg/mL) do S45, foi acrescido nos componentes do diluente, no caso da lactose a 11% no volume de 100mL de lipossoma. Após, realizou-se a retirada residual de etanol esse composto (lipossoma + diluente), onde foi aquecido o composto a 40°C em homogeneizador trans orbital até perda de 10% do volume inicial da solução, realizando ao final do processo a adição de água esterilizada deionizada (Aquatec®, Caithec, Brasil), para completar o volume final de 100mL.

Doses de sêmen

Para a realização deste estudo, as doses de sêmen foram adquiridas de uma central comercial de reprodutores suínos, localizado no município de Estrela - RS, distante a 325 km das nossas instalações laboratoriais. Neste experimento, utilizou doses de sêmen de 10 machos diferentes (n = 10), da mesma linhagem, mantidos em baias individuais e recebendo a mesma

ração. As doses foram compostas por ~ 80mL de uma fração do ejaculado (~2,6 bilhões de espermatozoides) diluídos em diluente comercial (Androstar®, Minitub, Alemanha).

Após a chegada no laboratório, foram mantidas por 90 min a 17°C. Em seguida, as doses foram homogeneizadas e 13,3mL foram distribuídos em cinco tubos de 15mL de capacidade e centrifugados a 800g, por 10min (centrífuga Baby FANEM, São Paulo, Brasil) (CHANAPIWAT; KAEOKET *et al.*, 2012). O sobrenadante foi descartado e o pellet formado em cada tubo, contendo aproximadamente 500 milhões de espermatozoides, foi ressuspensão em 334µL do diluente plasma-lactose-gema.

Tratamentos

Foram utilizadas cinco concentrações de lipossomas (Tabela 2), com 10 repetições cada e quatro avaliações ao longo do tempo.

Tabela 2. Tratamentos e concentrações do lipossoma

Tratamento	Concentração Inicial	Sol. LIPO 10mM (ml)	Gema Lactose (mL)	Plasma de gema - lactose - PL (ml)	Concentração final
T1	5nM	0,5	0		2,5
T2	3,75nM	0,375	0,125	0,5	1,875
T3	2,5nM	0,25	0,25	0,5	1,25
T4	1,25nM	0,125	0,375	0,5	0,625
T5	0nM			1	0

O processo de diluição do tratamento junto ao sêmen, foi inicialmente feito a distribuição do sêmen em tubos de 0,5ml, sendo adicionado 90µL. Em seguida adicionou-se 90µL do tratamento (lipossoma). Após esse processo, os tubos com os tratamentos + sêmen (já diluído) foi mantido a temperatura de 17°C, na caixa refrigerada da Minitube (Minitube, Alemanha) por duas horas para ocorrer estabilização da temperatura do sêmen e a incorporação dos lipossomas.

Após esse período, as doses da temperatura 17°C permaneceram na caixa refrigerada de 17°C. Já as doses da temperatura de 5°C, foram alocadas em uma bandeja plástica imersos em 1,5L de água a temperatura de 17°C. Sendo acondicionadas na caixa refrigerada da Minitube (Minitube, Alemanha) de 5°C, sendo realizadas a curva de resfriamento durante três horas, para ocorrer a redução gradual dos 17°C para os 5°C. Após atingir a temperatura, elas foram

transferidas e acondicionadas em racks para ependorf, sendo todo o processo realizado dentro da caixa térmica.

Avaliação da cinética espermática:

As avaliações ocorreram os seguintes tempos de armazenamento: 2h, 24h, 48h, 72h. Sendo que as amostras foram primeiro diluídas com tampão fosfato salino (PBS) + Soro de albumina sérica (BSA) antes das medições. Um total de 5 μ L de sêmen diluído foi adicionado a uma lâmina de câmara pré-aquecida (37 °C). Para cada amostra, foram contados no mínimo dez campos e no mínimo 300 espermatozoides. As seguintes variáveis foram analisadas: motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade em linha reta (VSL), velocidade média de percurso (VAP), linearidade (LIN), retidão (STR), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH), frequência cruzada do batimento (BCF), distância curvilínea (DCL); distância linear progressiva (DSL); e distância média da trajetória (DAP). Sendo utilizado o microscópio óptico acoplado a um sistema de análise de esperma auxiliado por sistema automatizado computer assisted sperm analysis – CASA- (Sperm Vision® 3.5, Minitub, Tiefenbach, Germany).

Análise de estatística:

Para realização das análises, adotou-se os tempos de análises como DIA 1 (12h), DIA 2 (24h), DIA 3 (48h), DIA 4 (72h). A análise estatística foi realizada no software Statistix 10TM. Sendo utilizado o Teste U de Mann-Whitney, e as médias foram comparados por meio de Análise de Variância, e Tukey, com intervalo de confiança de 95%.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O presente estudo é inovador, ao testar um lipossoma com 45% de fosfatidilcolina, obtidas de lecitinas de soja desengorduradas. Além disso, o período avaliado do processo *holding time* foi superior aos demais trabalhos e ainda usamos o armazenamento a 17°C e a 5°C.

Os resultados da cinética espermática das doses armazenadas a 17°C se encontram na tabela 3 e tabela 4. De uma forma geral, as doses armazenadas a 17°C a adição de lipossomas proporcionou ganho médio de 4,33% na cinética espermática, e 16% de ganho médio na motilidade em relação as doses sem LIPO. Os ganhos com a concentração de 5,0nM foi em 12 parâmetros no primeiro dia, exceto a LIN que o lipossoma não melhorou no primeiro dia,

necessitando 24h de armazenamento para que ocorra a melhora desse parâmetro. Já a partir do segundo dia, a concentração 3,75nM foi a melhor proporcionou ganhos nos parâmetros: M.T, M.P, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL e BCF, sendo exceção a LIN que a concentração de 5nM foi melhor. Resultados esses se mantiveram até o final das avaliações com 72h de armazenamento.

Como o objetivo dos lipossomas são de melhorar os parâmetros da cinética espermática, analisamos o percentual de ganho que foi obtido com os lipossomas em relação ao grupo controle (0nM) que não tinha lipossoma. E a concentração de 5nM proporcionou na M.T o ganho médio de 8,3% em comparação aos espermatozoides que não tinham lipossomas. Esse ganho foi de 19% no primeiro dia, 6,6% no segundo dia, 4,4% no terceiro dia e 3,1% no quarto dia.

Na M.P o ganho médio foi de 9,3% em relação ao grupo controle (sem LIPO), sendo de 13% no primeiro dia, 12,5% no segundo, 7,1% no terceiro dia e 4,5% no quarto dia. Embora que ao passar do tempo ocorre um decréscimo do percentual do ganho, podemos afirmar que o lipossoma S45 melhora os valores da cinética espermática no processo de *holding time* até 72h. Nos demais parâmetros, os lipossomas forneceram um ganho médio: de 5,7% no DAP, 8,7% na VAP, 8,2% na VSL, 4,3% no DSL, 0,2% no STR, 0,03% na LIN, 0,05 no WOB, 0,23 no ALH e 4,3% no BCF.

Porém, na velocidade curvilínea o LIPO proporcionalizou 32,55% de ganho médio quando comparado ao grupo sem lipossoma. Principalmente no segundo dia, a concentração de 3nmol deu um ganho de 57,5% na VCL em relação ao grupo sem LIPO. Mostrando que se faz necessário 24h de armazenamento a 17°C do sêmen com diluente a base de plasma-gema-lactose, acrescido de 3nmol para que ocorresse a melhora desse parâmetro.

Tabela 3. Valores da cinética espermática das doses armazenadas a 17°C em diferentes concentrações de lipossoma S45

Análise	Horas	Concentração(nM)				
		0	1,25	2,5	3,75	5,0
M.T	2	40,2 ± 21,3C	54,6 ± 13,6AB	40,4 ± 14,7 C	50,7 ± 10,7 B	59,2 ± 11,0 A
	24	25,5 ± 5,6 B	18,5 ± 6,7 C	17,9 ± 7,2 C	32,1 ± 6,4 A	25,8 ± 2,8 B
	48	16,1 ± 5,7 B	12,5 ± 5,6 C	12,5 ± 6,1 C	20,5 ± 7,1 A	17,4 ± 5,0 B
	72	11,3 ± 6,0 BC	9,3 ± 5,3 CD	7,8 ± 4,7 D	14,4 ± 8,0 A	12,6 ± 6,1 AB
M.P	2	25,9 ± 22,2C	34,8 ± 12,6 AB	22,7 ± 12,0 C	32,1 ± 11,0B	38,5 ± 11,6A
	24	9,3 ± 3,4 C	12,6 ± 6,2 B	11,3 ± 6,6 B	21,6 ± 6,8 A	11,2 ± 2,5 BC
	48	6,1 ± 2,9 C	8,4 ± 4,9 B	8,3 ± 5,7 B	13,2 ± 5,9 A	7,5 ± 2,6 BC
	72	4,1 ± 2,7 C	6,3 ± 4,2 B	4,9 ± 3,6 BC	9,8 ± 6,2 A	5,4 ± 2,8 BC
DAP	2	14,5 ± 3,2 C	15,7 ± 2,0 B	14,8 ± 1,7 BC	15,6 ± 1,7 B	16,8 ± 3,4 A
	24	13,7 ± 1,7 CD	12,7 ± 1,4 D	15,1 ± 4,3 B	23,4 ± 3,9 A	14,5 ± 0,9 BC
	48	8,7 ± 2,6 C	8,8 ± 2,2 C	10,2 ± 3,9 B	14,8 ± 5,1 A	9,8 ± 2,6 BC
	72	6,0 ± 3,0 B	6,4 ± 2,6 B	6,6 ± 3,5 B	10,5 ± 5,7 A	7,0 ± 3,3 B
DCL	2	20,2 ± 4,1 C	23,0 ± 3,2 AB	21,0 ± 2,8 C	22,6 ± 2,7 B	24,3 ± 5,0 A
	24	19,8 ± 3,4 C	19,4 ± 2,6 C	25,0 ± 12,6 B	49,0 ± 12,6 A	19,4 ± 2,2 C
	48	12,7 ± 4,1 C	13,4 ± 3,4 C	17,3 ± 9,8 B	30,5 ± 12,8 A	13,0 ± 3,7 C
	72	8,8 ± 4,6 B	9,7 ± 4,1 B	10,8 ± 7,2 B	22,1 ± 12,8 A	9,4 ± 4,5 B
DSL	2	10,4 ± 2,6 AB	10,2 ± 1,0 B	10,1 ± 1,0 B	10,1 ± 0,8 B	11,0 ± 2,5 A
	24	9,5 ± 0,9 D	9,4 ± 1,0 D	11,5 ± 3,2 B	17,5 ± 3,2 A	10,4 ± 1,0 C
	48	6,1 ± 1,7 C	6,6 ± 1,6 C	7,7 ± 2,9 B	11,0 ± 3,8 A	7,0 ± 2,0 BC
	72	4,2 ± 2,1 B	4,7 ± 1,9 B	5,0 ± 2,6 B	7,8 ± 4,2 A	5,0 ± 2,4 B
VAP	2	35,6 ± 7,6 D	38,7 ± 5,6 B	36,4 ± 4,2 CD	38,3 ± 4,3 BC	41,9 ± 8,5 A
	24	33,5 ± 4,5 CD	33,1 ± 3,4 D	36,9 ± 8,0 B	51,1 ± 7,1A	35,5 ± 2,9 BC
	48	21,5 ± 6,5 C	23,1 ± 5,6 BC	24,4 ± 8,2 B	32,4 ± 10,4 A	24,0 ± 6,7 BC
	72	14,8 ± 7,6 B	16,6 ± 6,9 B	16,3 ± 8,2 B	22,9 ± 12,2 A	17,2 ± 8,2 B

O processo de armazenamento do sêmen suíno ocasiona uma redução da qualidade quando armazenado por longos períodos (SHARAFI; BORGHEI-RAD *et al.*, 2022). Diante dessa questão avaliamos o potencial do lipossoma para evitar que ocorra uma redução dos valores dos parâmetros da cinética espermática durante o processo de *holding time*. Os resultados mostram a adição do lipossoma com 45% de fosfatidilcolina proporciona uma menor redução nos valores dos parâmetros da cinética espermática em 3,15%/dia na concentração de 3,75nM e 3,75%/dia na concentração de 2,5nM, versus 4,34%/dia sem a adição de LIPO. Mostrando que ele tem potencial de reduzir os danos que ocorrem na membrana plasmática durante o resfriamento dos espermatozoides.

Tabela 4. Valores da cinética espermática das doses armazenadas a 17°C em diferentes concentrações de lipossoma S45

Análise	Horas	Concentração(nM)				
		0	1,25	2,5	3,75	5,0
VCL	2	48,7 ± 10,6 C	56,5 ± 8,6 B	51,3 ± 7,1 C	55,4 ± 6,8 B	60,2 ± 11,9 A
	24	48,4 ± 9,6 C	50,0 ± 6,6 C	59,7 ± 25,0 B	105,9 ± 5,1 A	47,1 ± 6,1 C
	48	31,3 ± 10,7 C	34,7 ± 8,8 BC	40,5 ± 20,0 B	66,2 ± 26,5 A	31,7 ± 9,3 C
	72	21,5 ± 11,7 B	25,0 ± 10,5 B	26,0 ± 15,7 B	47,8 ± 27,2 A	22,8 ± 11,2 B
VSL	2	25,4 ± 6,6 B	25,4 ± 3,1 B	25,0 ± 2,7 B	25,0 ± 2,2 B	27,5 ± 6,7 A
	24	23,4 ± 2,8 D	24,7 ± 2,5 CD	28,2 ± 6,0 B	38,2 ± 5,8 A	25,7 ± 2,8 C
	48	15,1 ± 4,5 C	17,3 ± 4,2 B	18,5 ± 6,1 B	24,2 ± 7,9 A	17,3 v 5,1 B
	72	10,4 ± 5,3 B	12,4 ± 5,1 B	12,5 ± 6,3 B	17,1 ± 9,1 A	12,5 ± 6,1 B
STR	2	0,73 ± 0,1 A	0,67 ± 0,04 B	0,70 ± 0,06 AB	0,67 ± 0,06 B	0,72 ± 0,1 A
	24	0,72 ± 0,07 C	0,77 ± 0,06 A	0,79 ± 0,07 A	0,76 ± 0,04 AB	0,74 ± 0,06 BC
	48	0,47 ± 0,1 B	0,53 ± 0,1 A	0,50 ± 0,1 AB	0,49 ± 0,3 AB	0,50 ± 0,1 AB
	72	0,32 ± 0,1 B	0,38 ± 0,1 A	0,35 ± 0,1 AB	0,34 ± 0,1 AB	0,36 ± 0,1 AB
LIN	2	0,54 ± 0,1 A	0,46 ± 0,04 C	0,50 ± 0,06 B	0,46 ± 0,05 C	0,50 ± 0,1 B
	24	0,50 ± 0,07 B	0,51 ± 0,07 B	0,52 ± 0,1 B	0,38 ± 0,06 C	0,56 ± 0,08 A
	48	0,32 ± 0,1 B	0,35 ± 0,09 AB	0,33 ± 0,1 B	0,25 ± 0,09 C	0,38 ± 0,1 A
	72	0,22 ± 0,1 B	0,25 ± 0,1 AB	0,23 ± 0,1 AB	0,17 ± 0,09 C	0,27 ± 0,1 A
WOB	2	0,75 ± 0,1 A	0,70 ± 0,05 B	0,73 ± 0,06 AB	0,71 ± 0,05 B	0,77 ± 0,1 A
	24	0,71 ± 0,06 B	0,68 ± 0,05 C	0,67 ± 0,1 C	0,51 ± 0,1 D	0,78 ± 0,05 A
	48	0,46 ± 0,1 B	0,47 ± 0,1 B	0,42 ± 0,1 B	0,34 ± 0,1 C	0,52 ± 0,1 A
	72	0,31 ± 0,1	0,34 ± 0,1	0,30 ± 0,1	0,22 ± 0,1	0,37 ± 0,1
ALH	2	3,32 ± 0,7 C	3,62 ± 0,4 B	3,59 ± 0,3 B	3,63 ± 0,3 AB	3,85 ± 0,9 A
	24	3,65 ± 0,37 A	3,24 ± 0,3 B	3,32 ± 0,5 B	2,99 ± 0,4 C	3,71 ± 0,2 A
	48	2,34 ± 0,6 AB	2,24 ± 0,5 B	2,13 ± 0,6 BC	1,99 ± 0,6 C	2,50 ± 0,6 A
	72	1,62 ± 0,8	1,63 ± 0,6	1,58 ± 0,7	1,33 ± 0,7	1,80 ± 0,8
BCF	2	24,4 ± 6,0 A	24,1 ± 2,3 A	24,6 ± 3,5 A	24,2 ± 2,5 A	25,5 ± 6,0 A
	24	26,7 ± 4,8 C	27,9 ± 4,6 BC	29,0 ± 6,9 B	34,5 ± 4,3 A	24,5 ± 3,3 D
	48	17,3 ± 5,6 BC	18,9 ± 5,5 B	19,3 ± 6,4 B	21,8 ± 7,0 A	16,6 ± 5,0 C
	72	11,8 ± 6,3	14,1 ± 6,1	12,8 ± 6,8	15,5 ± 8,2	11,9 ± 5,9

Nas doses armazenadas a 5°C, com a adição de lipossomas permaneceram viáveis por 24h de armazenamento, proporcionando na concentração de 3,75nM ganho do percentual de 10 dos 13 parâmetros, com exceção: STR, LIN, WOB. De uma maneira geral, a concentração de 3,75nM gerou um ganho médio de 3,06% nos parâmetros da cinética espermática ao final de 24h de armazenamento. Quando comparado com o grupo controle (0nM), se teve um ganho de 0,67% na cinética espermática em relação ao grupo controle que teve um média de 2,39% na cinética espermática.

Tabela 5. Valores da cinética espermática das doses armazenadas a 5°C em diferentes concentrações de lipossoma S45

Análise	Horas	Concentração (nM)				
		0	1,25	2,5	3,75	5,0
M.T	2	31,6 ± 19,9BC	38,8 ± 23,9A	25,0 ± 20,1CD	21,8 ± 14,6D	33,1 ± 20,6AB
	24	40,1 ± 12,0A	19,3 ± 4,6C	41,3 ± 9,3A	29,4 ± 3,9B	40,1 ± 11,1A
M.P	2	15,2 ± 11,7BC	20,4 ± 15,7A	11,9 ± 14,9CD	9,3 ± 6,2D	17,3 ± 16,8AB
	24	20,2 ± 9,7A	5,3 ± 2,6C	19,0 ± 12,3A	14,9 ± 4,3B	18,6 ± 10,4A
DAP	2	14,9 ± 2,0AB	15,3 ± 2,6A	13,6 ± 2,8B	11,5 ± 4,5C	15,5 ± 7,8A
	24	17,5 ± 3,0A	13,9 ± 2,2B	10,7 ± 2,32C	13,9 ± 1,4B	13,1 ± 1,6B
DCL	2	21,6 ± 3,5A	22,4 ± 4,4A	18,7 ± 4,9B	16,4 ± 6,3C	21,1 ± 7,5A
	24	25,1 ± 4,5A	18,2 ± 3,4C	18,8 ± 3,8D	20,1 ± 2,5B	18,1 ± 1,9C
DSL	2	10,17 ± 1,1AB	10,2 ± 1,2AB	9,8 ± 1,6BC	8,5 ± 3,2C	11,3 ± 8,1A
	24	12,1 ± 1,6A	10,2 ± 2,1B	7,7 ± 1,2D	9,7 ± 0,7C	9,5 ± 1,5C
VAP	2	36,7 ± 5,0A	37,5 ± 6,7A	33,0 ± 6,6B	28,1 ± 10,8C	37,1 ± 15,6A
	24	41,8 ± 6,5	34,7 ± 6,5	25,2 ± 5,1	34,6 ± 3,7	31,1 ± 3,9
VCL	2	53,1 ± 8,7A	54,7 ± 11,6A	45,4 ± 12,6B	39,4 ± 15,5C	51,3 ± 15,1A
	24	60,0 ± 10,1	45,0 ± 9,0	36,8 ± 8,6	49,6 ± 6,4	42,5 ± 4,2
VSL	2	25,1 ± 3,0AB	25,0 ± 3,1AB	23,9 ± 3,8BC	21,0 ± 7,5C	27,5 ± 16,2A
	24	28,6 ± 2,7A	25,8 ± 6,0B	18,3 ± 2,6E	24,2 ± 2,0C	22,7 ± 3,7D
STR	2	0,71 ± 0,06CD	0,70 ± 0,08D	0,76 ± 0,1AB	0,78 ± 0,09A	0,74 ± 0,08BC
	24	0,71 ± 0,07	0,76 ± 0,07	0,76 ± 0,07	0,73 ± 0,05	0,75 ± 0,04
LIN	2	0,49 ± 0,06C	0,48 ± 0,08C	0,57 ± 0,1AB	0,60 ± 0,1A	0,54 ± 0,09B
	24	0,49 ± 0,05D	0,60 ± 0,10A	0,52 ± 0,06BC	0,50 ± 0,05CD	0,75 ± 0,04B
WOB	2	0,72 ± 0,05B	0,71 ± 0,05B	0,77 ± 0,09A	0,76 ± 0,09A	0,75 ± 0,07A
	24	0,72 ± 0,03C	0,80 ± 0,08A	0,71 ± 0,03C	0,72 ± 0,04C	0,75 ± 0,04B
ALH	2	3,7 ± 0,3A	3,7 ± 0,5A	3,4 ± 0,6B	3,0 ± 1,2C	3,5 ± 0,6AB
	24	4,0 ± 0,5A	3,8 ± 0,5AB	2,2 ± 0,8D	3,6 ± 0,1B	3,0 ± 0,4C
BCF	2	25,8 ± 3,9AB	26,1 ± 4,8A	25,1 ± 4,8AB	23,6 ± 9,6B	25,3 ± 4,8AB
	24	24,2 ± 5,5B	24,4 ± 4,7B	22,2 ± 4,0C	27,3 ± 2,5A	21,7 ± 3,3C

As médias seguidas da mesma letra em cada coluna não diferiram, comparando-se a média dos parâmetros analisados nas concentrações do lipossoma, pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Podemos observar que na motilidade com 24h de armazenamento proporcionaram um ganho médio de 4,05% nos valores da motilidade total. No entanto, a adição de LIPO proporcionou melhor resultado na MT com 1nM, no primeiro dia, com ganho de 7,21% e a concentração de 5nM com ganho de 1,44% em relação ao controle (0nM). No segundo dia, 24h de armazenamento, que a concentração de 1nM havia proporcionado melhor resultado no primeiro dia, acarretou no pior resultado no segundo dia, tendo um decréscimo de 19,6%. O destaque fica com a concentração de 2,5nM que foi melhor por ter proporcionado um ganho de 16,26% em relação ao primeiro dia, seguido pela concentração de 3,75nM. Na motilidade progressiva, o processo de holding time a 5°C proporcionou ganho médio de 0,8% com 24h de

armazenamento. Com a adição de lipossoma, na concentração de 1nM no primeiro dia de análise proporcionou o melhor resultado, com ganho de 0,15% em relação ao grupo controle (0nM). Porém no segundo dia, ocorreu a mesma situação da MT, em que ocorre um decréscimo de 15,09% em relação ao primeiro dia.

Essa queda dos valores da cinética espermática do primeiro para do segundo dia, foi observado na concentração de 2,5nM não se mostrando eficiente na melhora em 11 dos 13 parâmetros, sendo a exceção a M.T e M.P. Na concentração 1,25nM, a melhora dos parâmetros ocorreu no segundo dia em: VSL, ALH, nos demais teve um decréscimo em relação ao primeiro dia. Com isso, podemos afirmar que a concentração de 3,5nM foi a melhor que proporcionou estabilidade nos valores dos parâmetros da cinética espermática e ainda foi que proporcionou ganho de valores em relação ao primeiro dia. Mostrando que o lipossoma utilizado com 45% de fosfatidilcolina, assegurou uma crioproteção aos espermatozoides.

O processo “holding time” feito a 5°C por 24h proporciona melhora em alguns parâmetros, principalmente na motilidade total e progressiva. Analisando a concentração de 0nM ocorreu incremento 8,48% na motilidade total e 5,07% na motilidade progressiva para o segundo dia. E quando adicionado os lipossomas, ocorreu um incremento na motilidade total de 16,28% com 2,5nM, 7,84% na concentração de 3,75nM, 6,98% na 5nM de concentração. A exceção foi com a concentração de 1,25nM que teve um decréscimo de 19,54%. Quando analisados todos os parâmetros, os melhores resultados foram na concentração de 0nmol com aumento em 11 de 13 parâmetros, seguido pela concentração de 3,75nmol que obteve 10 de 13 parâmetros. A concentração de 0nM os parâmetros que aumentaram foram: Motilidade total, motilidade progressiva, WOB, ALH, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL, VSL, STR e decréscimo em: BCF e LIN. Já a concentração de 3,75nM o incremento ocorreu nos parâmetros: motilidade total, motilidade progressiva, ALH, BCF, DAP, DCL, DSL, VAP, VCL e decréscimo em STR, LIN e WOB. E os piores resultados, foram com a concentração de 2,5nM que em 24h de armazenamento prejudicou 11 dos 13 parâmetros, apenas a motilidade total e progressiva aumentaram, depois a concentração de 5nM afetou negativamente 9 dos 13 parâmetros, apenas a motilidade total, motilidade progressiva, LIN e STR obtiveram aumento com 24h de armazenamento. A concentração de 1,25nM 7 dos 13 parâmetros aumentaram com 24h de armazenamento, sendo eles: WOB, ALH, DSL, VSL, STR, LIN, os demais parâmetros diminuíram os valores.

Quando comparamos o tempo de 24h de armazenamento das doses a 5°C e a 17°C, observamos que as doses armazenadas a 5°C obtiveram melhores resultados na motilidade total e motilidade progressiva nas concentrações de 0nM, 2,5nM e 5nM, sendo superiores as doses armazenadas a 17°C. Na concentração de 0nmol a 17°C a motilidade total foi de 25,59% e a 5°C foi de 40,17%, na motilidade progressiva a 17°C foi 9,31% contra 20,27% a 5°C. Com a concentração 2,5nM a motilidade total a 17°C foi 17,93% e a 5°C foi de 41,33%, tendo uma diferença de 23,40% de motilidade a mais quando armazenado a 5°C; na motilidade progressiva a 17°C foi 11,4% contra 19,07% a 5°C, um acréscimo de 5,41%.

De uma forma geral a concentração de 3,75nM de lipossoma, quando adicionado no sêmen e associado ao processo “holding-time” ocorreu melhora na maioria dos parâmetros de cinética espermática, tanto nas doses armazenadas a 17°C e a 5°C. Nas doses armazenadas a 5°C, os parâmetros se mostraram melhores no segundo dia, quando comparado ao primeiro dia. Esses resultados corroboram com Teixeira et al.; (2019) que o processo “holding-time” melhora os parâmetros de cinética espermática principalmente quando eles ficam por dois dias, a motilidade total teve um incremento de 16,28%, sendo superior aos valores obtidos por Teixeira et al (2019). Essa melhora da motilidade total e progressiva, das doses armazenadas a 5°C sejam relacionadas ao processo HT proporciona um arranjo lipídico na membrana plasmática (CASAS; ALTHOUSE, 2013a).

Alguns estudos apontam que os espermatozoides armazenados a 5°C diminui a motilidade quando comparado aos que são armazenados a 15°C (ERIKSSON; VAZQUEZ *et al.*, 2001). No entanto, observamos que a motilidade total e a motilidade progressiva dos espermatozoides armazenados a 5°C, tenha sido inferior no início quando comparado com os armazenados a 17°C. Porém, com 24h de armazenamento os que estavam a 5°C ocorreu uma melhora nos valores de todos os parâmetros da cinética espermática, sendo esses resultados diferentes dos obtidos por ERIKSSON; VAZQUEZ *et al.* (2001), os quais constataram que houve pequenas alterações dos espermatozoides móveis quando armazenados no HT a 5°C.

Estudos avaliando o período de “holding-time” são controversos conforme pois em alguns trabalhos avaliam esse tempo de espera a uma temperatura de 10°C por 24h, outros avaliam a 17°C (TORRES; MONTEIRO *et al.*, 2019a). Os resultados obtidos em 24h de armazenamento, diferem dos resultados obtidos por TORRES; MONTEIRO *et al.* (2019b), pois não se obteve uma melhora da motilidade total e ou progressiva. Além disso, notamos que as

doses armazenadas a 5°C ocorreu uma melhora na motilidade total e progressiva com 24h de armazenamento, diferentemente dos resultados obtidos por (CASAS; ALTHOUSE, 2013a).

Porém, o nosso trabalho avaliou por até 72h, sendo um longo período. Os resultados obtidos na Motilidade Total são iguais aos obtidos por Yeste et al (2014), no qual o tempo de armazenamento reduziu a motilidade total. Os resultados mostram que aumentando tempo de refrigeração, ocasiona uma redução da motilidade total e progressiva drasticamente. No entanto, quando adicionamos os lipossomas os resultados foram melhores do que as doses que não possuíam os lipossomas, sendo diferente aos resultados observados por Tómas et al (2014). Resultados são semelhantes aos obtidos por (HE; BAILEY *et al.*, 2001) que também observaram melhora na motilidade progressiva com a adição de lipossomas. Com isso, a adição deles proporciona uma melhora nos parâmetros dos espermatozoides quando submetidos ao processo “holding time” a 17°C. Isso seja decorrente da formulação dos lipossomas utilizados que possuíam lecitina de soja, que promove uma melhor regeneração da membrana plasmática durante o processo de congelamento – descongelamento(SAADELDIN; KHALIL *et al.*, 2020).

Hoje o processo *holding time* por até 24 horas a uma temperatura acima de 15°C estabiliza a arquitetura lipídica da membrana plasmática (CASAS; ALTHOUSE, 2013a), no entanto o armazenamento a 5°C se faz necessário uma redução da temperatura abaixo dos 15°C, ocasionando grandes alterações nas células espermática (RODRIGUEZ-MARTINEZ; MARTINEZ *et al.*, 2021). No entanto, observamos que a adição de lipossoma na concentração de 2,5nM e 5nM nas doses armazenadas a 5°C mostrou-se superior na M.T quando comparado as doses armazenadas a 17°C. Mostrando que o lipossoma previne alguns danos que ocorrem quando os espermatozoides são submetidos a temperaturas abaixo de 15°C. As quais são a perda de motilidade, funcionalidade da membrana plasmática e integridade do acrossoma (TORRES; PEDROSA *et al.*, 2022).

O lipossoma utilizado possui em sua composição a lisofosfatidilcolina, um potente agente fusogénico capaz de promover a fusão celular que pode causar alterações na permeabilidade da membrana mesmo em pequenas quantidade (MICHELON; *et al.*, 2016), o que pode ter ajuda a disponibilizar a membrana plasmática. Seu processo de fabricação foi diferente de HE; BAILEY *et al.* (2001) que utilizou lipossomas a base da membrana plasmática a cabeça do espermatozoide e outros de lipídios comerciais.

Ainda ele foi fabricado utilizando como base lecitina de soja e associando com o diluente a base de gema de ovo, pode ter contribuído para esses resultados obtidos serem

melhores a 5°C. Porque a lectina de soja possui componentes ativos como o ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico e fosfatidilcolina, ambos são inteiramente idênticos a gema de ovo (LAYEK; MOHANTY *et al.*, 2016). Ainda confere estabilidade física às células espermáticas (OKE; JACOB *et al.*, 2010), atenuando o efluxo de colesterol ou fosfolipídios reduzindo assim a formação de cristais de gelo intracelulares (SUN; HE *et al.*, 2021). Além disso, alguns autores apontam que a lecitina de soja, pode promover uma substituição dos fosfolipídios perdidos da membrana plasmática (ZHANG; HU *et al.*, 2009), incorporação de lipídios exógenos na membrana (HE; BAILEY *et al.*, 2001) ou sua capacidade de formar uma camada protetora sobre a membrana plasmática (ONDŘEJ; JIŘÍ *et al.*, 2019)

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos são promissores dentro do processo da criopreservação do sêmen suíno. Além do estudo foi inédito, avaliando um lipossoma produzido com 45% fosfatidilcolina a partir da lecitina de soja, e ainda que foi produzido pelo método de injeção de etanol. A utilização do lipossoma S45 no processo holding time, previne alguns danos que ocorrem quando os espermatozoides são submetidos a temperaturas abaixo de 15°C, tornando os espermatozoides crioessistentes. Mais ainda quando eles são submetidos ao processo holding time por 24h a uma temperatura de 5°C, proporciona resultados melhores do que quando são armazenados a 17°C.

No entanto, longos períodos de holding time a 17°C superiores a 24h tornam-se inviáveis por ocasionar uma redução dos valores da motilidade espermática principalmente. E quando armazenados a 5°C, tempo superior a 24h ocasiona um efeito deletério as células espermáticas.

AGRADECIMENTOS:

Agradecemos a Associação de Criadores de Suínos do Rio Grande do Sul (ACSUR) por ter fornecido as doses de sêmen. Este trabalho foi realizado durante bolsa financiada pela CAPES – Agência Federal de Apoio e Avaliação da Pós-Graduação do Ministério da Educação do Brasil do primeiro autor (308152/2019).

REFERENCIAS

- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C. *et al.* Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology**, 61, n. 5, p. 895-907, Apr 1 2004.
- BALBINO, T. A.; AOKI, N. T.; GASPERINI, A. A. M.; OLIVEIRA, C. L. P. *et al.* Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, 226, p. 423-433, 2013.
- BIANCH, I. B. I.; MADEIRA, E. M.; SCHNEIDER, A.; RABASSA, V. R. *et al.* Efeito de dif o de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de r os de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. **Acta Scientiae Veterinariae**, 39, 2011.
- BRASIL. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. (Brasília, 8 de outubro de 2008;). 2008.
- BRITO, C. R. C.; VARELA JUNIOR, A. S.; GHELLER, S. M. M.; ACOSTA, I. B. *et al.* High-speed centrifugation of extender of freeze-thaw boar semen. **Reproduction in Domestic Animals**, 56, n. 5, p. 821-825, 2021.
- CASAS, I.; ALTHOUSE, G. C. The protective effect of a 17 degrees C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 degrees C. **Cryobiology**, 66, n. 1, p. 69-75, Feb 2013a.
- CASAS, I.; ALTHOUSE, G. C. The protective effect of a 17°C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5°C. **Cryobiology**, 66, n. 1, p. 69-75, Feb 2013b.
- CHANAPIWAT, P.; KAEOKET, K.; TUMMARUK, P. Cryopreservation of Boar Semen by Egg Yolk-Based Extenders Containing Lactose or Fructose is Better Than Sorbitol. **Journal of Veterinary Medical Science**, 74, n. 3, p. 351-354, 2012.
- ERIKSSON, B. M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J. *et al.* Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. **Theriogenology**, 55, n. 8, p. 1593-1605, May 1 2001.
- GALE, I.; GIL, L.; MALO, C.; GONZALEZ, N. *et al.* Effect of Camellia sinensis supplementation and increasing holding time on quality of cryopreserved boar semen. **Andrologia**, 47, n. 5, p. 505-512, Jun 2015.

GALE, I.; GIL, L.; MALO, C.; GONZÁLEZ, N. *et al.* Effect of *Camellia sinensis* supplementation and increasing holding time on quality of cryopreserved boar semen. 47, n. 5, p. 505-512, 2015.

HE, L.; BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential1. **Biology of Reproduction**, 64, n. 1, p. 69-79, 2001.

KNOX, R. The Fertility of Frozen Boar Sperm When used for Artificial Insemination. **Reproduction in Domestic Animals**, 50, n. S2, p. 90-97, 2015.

KUMAR, P.; SAINI, M.; KUMAR, D.; BALHARA, A. K. *et al.* Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Animal Reproduction Science**, 159, p. 38-45, 2015/08/01/ 2015.

LAYEK, S. S.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Anim Reprod Sci**, 172, p. 1-9, Sep 2016.

LUNA-OROZCO, J. R.; GONZÁLEZ-RAMOS, M. A.; CALDERÓN-LEYVA, G.; GAYTÁN-ALEMÁN, L. R. *et al.* Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. **Iran J Vet Res**, 20, n. 2, p. 126-130, Spring 2019.

MAFOLO, K. S.; PILANE, C. M.; CHITURA, T.; NEDAMBALE, T. L. Use of phosphatidylcholine in Tris-based extender with or without egg yolk to freeze Bapedi ram semen. **South African Journal of Animal Science**, 50, n. 3, p. 389-396, 2020.

MEDINA-LEÓN, A. Z.; DOMÍNGUEZ-MANCERA, B.; CAZALEZ-PENINO, N.; CERVANTES-ACOSTA, P. *et al.* Cryopreservation of horse semen with a liposome and trehalose added extender. **Austral journal of veterinary sciences**, 51, p. 119-123, 2019.

MICHELON; , M.; MANTOVANI; , R. A. *et al.* Structural characterization of β -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. **Food Research International**, 79, p. 95-105, 2016.

MICHELON;, M.; MANTOVANI;, R. A.; SINIGAGLIA-COIMBRA;, R.; TORRE;, L. G. d. l. *et al.* Structural characterization of β -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. **Food Research International**, 79, p. 95-105, 2016.

MORTAZAVI, S.-H.; ESLAMI, M.; FARROKHI-ARDABILI, F. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. **Animal Reproduction Science**, 219, p. 106533, 2020/08/01/ 2020.

OKE, M.; JACOB, J.; PALIYATH, G. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. **Food Research International**, 43, p. 232-240, 01/31 2010.

ONDŘEJ, Š.; JIŘÍ, Š.; JAN, B.; PAVLA, M. P. *et al.* Low Density Lipoprotein - important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin-based bull semen extenders. **Anim Reprod**, 16, n. 2, p. 267-276, Oct 23 2019.

PASCHOAL, A. F. L.; LUTHER, A. M.; JAKEL, H.; SCHEINPFLUG, K. *et al.* Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5 degrees C. **PLoS One**, 15, n. 6, p. e0234339, 2020.

PILLET, E.; LABBE, C.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G. *et al.* Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology**, 77, n. 2, p. 268-279, 2012/01/15/ 2012.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ESTRADA, E. Artificial Insemination in Boar Reproduction. *In*: BONET, S.; CASAS, I., *et al.* (Ed.). **Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 589-607.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ, E. A.; CALVETE, J. J.; PEÑA VEGA, F. J. *et al.* Seminal Plasma: Relevant for Fertility? **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n. 9, DOI: 10.3390/ijms22094368.

ROPKE, T.; OLDENHOF, H.; LEIDING, C.; SIEME, H. *et al.* Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. **Theriogenology**, 76, n. 8, p. 1465-1472, Nov 2011.

RÖPKE, T.; OLDENHOF, H.; LEIDING, C.; SIEME, H. *et al.* Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. **Theriogenology**, 76, n. 8, p. 1465-1472, 2011/11/01/ 2011.

SAADELDIN, I. M.; KHALIL, W. A.; ALHARBI, M. G.; LEE, S. H. The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. **Animals (Basel)**, 10, n. 12, Dec 3 2020.

SHARAFI, M.; BORGHEI-RAD, S. M.; HEZAVEHEI, M.; SHAHVERDI, A. *et al.* Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. **Animals**, v.12, n. 23, DOI: 10.3390/ani12233271.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. **Reproduction**, 146, n. 1, p. R21-35, Jul 2013.

SUN, L.; HE, M.; WU, C.; ZHANG, S. *et al.* Beneficial Influence of Soybean Lecithin Nanoparticles on Rooster Frozen-Thawed Semen Quality and Fertility. **Animals (Basel)**, 11, n. 6, Jun 13 2021.

TAOUZINET, L.; FATMI, S.; LAHIANI-SKIBA, M.; SKIBA, M. *et al.* Encapsulation Nanotechnology in Sperm Cryopreservation: Systems Preparation Methods and Antioxidants Enhanced Delivery. **Cryo Letters**, 42, n. 1, p. 1-12, Jan-Feb 2021.

TOMÁS, C.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; DE MERCADO, E. Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. **Animal Reproduction Science**, 144, n. 3, p. 115-121, 2014/01/30/ 2014.

TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; PASSARELLI, M. S.; PAPA, F. O. *et al.* The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to short-cryopreservation protocols. **Cryobiology**, 86, p. 58-64, Feb 2019a.

TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; PASSARELLI, M. S.; PAPA, F. O. *et al.* The ideal holding time for boar semen is 24h at 17 degrees C prior to short-cryopreservation protocols. **Cryobiology**, 86, p. 58-64, Feb 2019b.

TORRES, M. A.; PEDROSA, A. C.; NOVAIS, F. J.; ALKMIN, D. V. *et al.* Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability†. **Biology of Reproduction**, 106, n. 1, p. 213-226, 2022.

WABERSKI, D.; RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; WEITZE, K. F. *et al.* Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. **Theriogenology**, 137, p. 2-7, 2019/10/01/ 2019.

WASILEWSKA, K.; FRASER, L. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. **Animal Reproduction Science**, 185, p. 161-173, 2017/10/01/ 2017.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, 85, n. 1, p. 47-64, Jan 1 2016.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; RIVERA DEL ÁLAMO, M.-M.; BONET, S. *et al.* The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17°C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. **PLoS one**, v.9, n. 3, p. e90887, DOI: 10.1371/journal.pone.0090887.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; RIVERA DEL ALAMO, M. M.; BONET, S. *et al.* The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17

degrees C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e90887, 2014.

YESTE, M.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. **Molecular Reproduction and Development**, 84, n. 9, p. 802-813, 2017.

ZHANG, S.-S.; HU, J.-H.; LI, Q.-W.; JIANG, Z.-L. *et al.* The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. **African Journal of Biotechnology**, 8 (22), 2009.

4 Considerações Finais

Com os resultados alcançados neste estudo conclui se que:

- O processo *holding-time* antes de realizar o processo da criopreservação é importante para melhora dos parâmetros de cinética espermática;
- O armazenamento do sêmen durante o processo *holding time* à temperatura de 5°C durante 24h, proporciona melhora nos parâmetros da cinética espermática,
- A concentração de 3,75nM de lipossoma foi a concentração que resultou nos melhores resultados do lipossoma S45,

Referências

ABPA, A. B. d. P. A. RELATÓRIO ANUAL DA ABPA. 2022. Disponível em: <http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2022/05/Relatorio-Anual-ABPA-2022-1.pdf>. Acesso em: 01.

ALMLID, T.; JOHNSON, L. A. Effects of glycerol concentration, equilibration time and temperature of glycerol addition on post-thaw viability of boar spermatozoa frozen in straws. *J Anim Sci*, 66, n. 11, p. 2899-2905, Nov 1988.

ALMLID, T.; STAVNE, S. E.; JOHNSON, L. Fertility evaluation of the straw freezing technique for boar semen under practical artificial insemination conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 22, p. 193-202, 10/09 2007.

ALONSO, C. N.; CASTAÑEIRA, C.; BRAGULAT, A. F.; LOSINNO, L. Effect of egg yolk-based extender and seminal plasma removal on sperm viability of cooled donkey semen. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 58, p. e174301, 2021.

ALVAREZ-RODRIGUEZ, M.; VICENTE-CARRILLO, A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Exogenous Individual Lecithin Phospholipids (Phosphatidylcholine and Phosphatidylglycerol) Cannot Prevent the Oxidative Stress Imposed by Cryopreservation of Boar Sperm. *Journal of Veterinary Medicine and Surgery*, 1, 2017.

AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C. et al. Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, 61, n. 5, p. 895-907, Apr 1 2004.

ANTIMISIARIS, S. G.; MOURTAS, S.; MARAZIOTI, A. Exosomes and Exosome-Inspired Vesicles for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 10, n. 4, Nov 6 2018.

ANZAR, M.; RAJAPAKSHA, K.; BOSWALL, L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *PLOS ONE*, 14, n. 10, p. e0223977, 2019a.

ANZAR, M.; RAJAPAKSHA, K.; BOSWALL, L. Egg yolk-free cryopreservation of bull semen. *PloS one*, 14, n. 10, p. e0223977-e0223977, 2019b.

BALBINO, T. A.; AOKI, N. T.; GASPERINI, A. A. M.; OLIVEIRA, C. L. P. et al. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. *Chemical Engineering Journal*, 226, p. 423-433, 2013.

BENCHARIF, D.; DORDAS-PERPINYA, M. Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last 20 years. *Reprod Domest Anim*, 55 Suppl 2, p. 61-65, Jul 2020.

BIANCHI, I. B. I.; MADEIRA, E. M.; SCHNEIDER, A.; RABASSA, V. R. et al. Efeito de diferentes métodos de congelamento, diluentes e tempos de resfriamento sobre a qualidade do sêmen suíno criopreservado. *Acta Scientiae Veterinariae*, 39, 2011.

BOE-HANSEN, G. B.; CHRISTENSEN, P.; VIBJERG, D.; NIELSEN, M. B.; HEDEBOE, A. M. Sperm chromatin structure integrity in liquid stored boar semen and its relationships with field fertility. *Theriogenology*, 69, n. 6, p. 728-736, Apr 1 2008.

BRASIL. LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. (Brasília, 8 de outubro de 2008). 2008.

BRITO, C. R. C.; VARELA JUNIOR, A. S.; GHELLER, S. M. M.; ACOSTA, I. B.; ANCIUTI, A. N.; GATTI, N. L. S.; SILVA, E. A.; KNABAH, N. W.; CORCINI, C. D. High-speed centrifugation of extender of freeze-thaw boar semen. *Reproduction in Domestic Animals*, 56, n. 5, p. 821-825, 2021.

BUSTANI, G. S.; BAIEE, F. H. Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semen extenders. *Veterinary World*, p. 1220-1233, 2021.

CASAS, I.; ALTHOUSE, G. C. The protective effect of a 17 degrees C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5 degrees C. *Cryobiology*, 66, n. 1, p. 69-75, Feb 2013a.

CASAS, I.; ALTHOUSE, G. C. The protective effect of a 17°C holding time on boar sperm plasma membrane fluidity after exposure to 5°C. *Cryobiology*, 66, n. 1, p. 69-75, Feb 2013b.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BALLESTER, J.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; FÀBREGA, A.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. The HSP90AA1 sperm content and the prediction of the boar ejaculate freezability. *Theriogenology*, 74, n. 6, p. 940-950, Oct 1 2010.

CASAS, I.; SANCHO, S.; BRIZ, M.; PINART, E.; BUSSALLEU, E.; YESTE, M.; BONET, S. Freezability prediction of boar ejaculates assessed by functional sperm parameters and sperm proteins. *Theriogenology*, 72, n. 7, p. 930-948, Oct 15 2009.

CHANAPIWAT, P.; KAEOKET, K.; TUMMARUK, P. Cryopreservation of Boar Semen by Egg Yolk-Based Extenders Containing Lactose or Fructose is Better Than Sorbitol. *Journal of Veterinary Medical Science*, 74, n. 3, p. 351-354, 2012.

CÓRDOVA, A.; PÉREZ-GUTIÉRREZ, J. F.; LLEÓ, B.; GARCÍA-ARTIGA, C.; ALVAREZ, A.; DROBCHAK, V.; MARTÍN-RILLO, S. In vitro fertilizing capacity and chromatin condensation of deep-frozen boar semen packaged in 0.5- and 5-ml straws. *Theriogenology*, 57, n. 8, p. 2119-2128, 2002/05/01/ 2002.

CORRÊA, M. N.; JÚNIOR, T. L.; DESCHAMPS, J. C.; SERRET, C. G.; BORDIGNON, J.; RAMBO, G. Taxa de penetração espermática in vitro em ovócitos suínos utilizando espermatozóides acondicionados com o diluente PIGPEL-5 à 5°C. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 3, 28, p. 161-169, 2004.

DAVIS, T. C.; WHITE, R. R. Breeding animals to feed people: The many roles of animal reproduction in ensuring global food security. *Theriogenology*, 150, p. 27-33, 2020/07/01/ 2020.

ECROYD, H.; JONES, R. C.; AITKEN, R. J. Tyrosine phosphorylation of HSP-90 during mammalian sperm capacitation. *Biol Reprod*, 69, n. 6, p. 1801-1807, Dec 2003.

EL-KERABY, F.; OSMAN, K.; GANAH, H.; EL-SIEFY, E. SOYMILK-BASED EXTENDER FOR CRYOPRESERVATION OF BOVINE SEMEN. *Journal of Animal and Poultry Production*, 1, n. 2, p. 61-69, 2010.

ERIKSSON, B. M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; LUCAS, X.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and in vitro oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. *Theriogenology*, 55, n. 8, p. 1593-1605, May 1 2001.

FENG, T.-Y.; LV, D.-L.; ZHANG, X.; DU, Y.-Q. et al. Rosmarinic acid improves boar sperm quality, antioxidant capacity and energy metabolism at 17°C via AMPK activation. *Reproduction in Domestic Animals*, 55, n. 12, p. 1714-1724, 2020.

FRASER, L.; STRZEŻEK, J.; KORDAN, W. Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Anim Reprod Sci*, 147, n. 3-4, p. 119-127, Jun 30 2014.

GALE, I.; GIL, L.; MALO, C.; GONZALEZ, N. et al. Effect of *Camellia sinensis* supplementation and increasing holding time on quality of cryopreserved boar semen. *Andrologia*, 47, n. 5, p. 505-512, Jun 2015.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146, n. 3, p. 276-290, 2010/09/15/ 2010.

GOODE, P.; ELLSE, L.; WALL, R. Preventing tick attachment to dogs using essential oils. *Ticks Tick Borne Dis*, 9, n. 4, p. 921-926, May 2018.

GUPTA, S.; FINELLI, R.; AGARWAL, A.; HENKEL, R. Total antioxidant capacity- Relevance, methods and clinical implications. *Andrologia*, 53, n. 2, p. e13624, Mar 2021.

GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Impact of storage prior to cryopreservation on plasma membrane function and fertility of boar sperm. *Theriogenology*, 63, n. 2, p. 396-410, 2005/01/15/ 2005.

HE, L.; BAILEY, J. L.; BUHR, M. M. Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential¹. *Biology of Reproduction*, 64, n. 1, p. 69-79, 2001.

HERMANSSON, U.; JOHANNISSON, A.; AXNER, E. Cryopreservation of dog semen in a Tris extender with two different 1% soybean preparations compared with a Tris egg yolk extender. *Vet Med Sci*, Feb 11 2021.

HERMANSSON, U.; JOHANNISSON, A.; AXNÉR, E. Cryopreservation of dog semen in a Tris extender with two different 1% soybean preparations compared with a Tris egg yolk extender. *Veterinary medicine and science*, 7, n. 3, p. 812-819, 2021.

HÖFNER, L.; LUTHER, A.-M.; PALLADINI, A.; FRÖHLICH, T.; WABERSKI, D. Tolerance of Stored Boar Spermatozoa to Autologous Seminal Plasma: A Proteomic and Lipidomic Approach. *International Journal of Molecular Sciences*, v.21, n. 18, DOI: 10.3390/ijms21186474.

HUANG, S. Y.; KUO, Y. H.; LEE, W. C.; TSOU, H. L.; LEE, Y. P.; CHANG, H. L.; WU, J. J.; YANG, P. C. Substantial decrease of heat-shock protein 90 precedes the

decline of sperm motility during cooling of boar spermatozoa. *Theriogenology*, 51, n. 5, p. 1007-1016, Apr 1 1999.

JOHNSON, L. A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. Storage of boar semen. *Anim Reprod Sci*, 62, n. 1-3, p. 143-172, Aug 18 2000.

JUDDE, A.; VILLENEUVE, P.; ROSSIGNOL-CASTERA, A.; LE GUILLOU, A. Antioxidant effect of soy lecithins on vegetable oil stability and their synergism with tocopherols. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 80, n. 12, p. 1209-1215, 2003/12/01 2003.

KENNEDY, B. E.; CHARMAN, M.; KARTEN, B. Niemann-Pick Type C2 protein contributes to the transport of endosomal cholesterol to mitochondria without interacting with NPC1. *J Lipid Res*, 53, n. 12, p. 2632-2642, Dec 2012.

KIRTI, K.; AMITA, S.; PRITI, S.; MUKESH KUMAR, A. et al. Colorful World of Microbes: Carotenoids and Their Applications. *Advances in Biology*, 2014, p. 1-13, 2014.

KNOX, R. The Fertility of Frozen Boar Sperm When used for Artificial Insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, 50, n. S2, p. 90-97, 2015.

KUMAR, P.; SAINI, M.; KUMAR, D.; BALHARA, A. K. et al. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. *Animal Reproduction Science*, 159, p. 38-45, 2015/08/01/ 2015.

LAYEK, S. S.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean-based extenders. *Anim Reprod Sci*, 172, p. 1-9, Sep 2016.

LEAHY, T.; GADELLA, B. M. Capacitation and capacitation-like sperm surface changes induced by handling boar semen. *Reprod Domest Anim*, 46 Suppl 2, p. 7-13, Sep 2011.

LEE, E.; KIM, D. Effects of Astaxanthin on Miniature Pig Sperm Cryopreservation. *BioMed Research International*, 2018, p. 1-9, 2018.

LÉGARÉ, C.; THABET, M.; GATTI, J. L.; SULLIVAN, R. HE1/NPC2 status in human reproductive tract and ejaculated spermatozoa: consequence of vasectomy. *Mol Hum Reprod*, 12, n. 7, p. 461-468, Jul 2006.

LONG, J.; CONN, T. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 C for 24 hours. *Poultry science*, 91, n. 8, p. 1990-1996, 2012.

LUNA-OROZCO, J. R.; GONZÁLEZ-RAMOS, M. A.; CALDERÓN-LEYVA, G.; GAYTÁN-ALEMÁN, L. R. et al. Comparison of different diluents based on liposomes and egg yolk for ram semen cooling and cryopreservation. *Iran J Vet Res*, 20, n. 2, p. 126-130, Spring 2019.

MAFOLO, K. S.; PILANE, C. M.; CHITURA, T.; NEDAMBALE, T. L. Use of phosphatidylcholine in Tris-based extender with or without egg yolk to freeze Bapedi ram semen. *South African Journal of Animal Science*, 50, n. 3, p. 389-396, 2020.

MEDINA-LEÓN, A. Z.; DOMÍNGUEZ-MANCERA, B.; CAZALEZ-PENINO, N.; CERVANTES-ACOSTA, P. et al. Cryopreservation of horse semen with a liposome and trehalose added extender. *Austral journal of veterinary sciences*, 51, p. 119-123, 2019.

MEHDIPOUR, M.; DAGHIGH KIA, H.; NAZARI, M.; NAJAFI, A. Effect of lecithin nanoliposome or soybean lecithin supplemented by pomegranate extract on post-thaw flow cytometric, microscopic and oxidative parameters in ram semen. *Cryobiology*, 78, p. 34-40, Oct 2017.

MERKIES, K.; BEAN, L. D.; BOEHNKE, K.; BUHR, M. M. Effect of select lipids and vitamin E on motility and viability of liquid and cryopreserved boar spermatozoa. 83, n. 1, p. 81-88, 2003.

MICHELON, M.; DE MATOS DE BORBA, T.; DA SILVA RAFAEL, R.; BURKERT, C. A. V. et al. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. *Food Science and Biotechnology*, 21, n. 1, p. 1-8, 2012/02/01 2012.

MICHELON, M.; MANTOVANI, R. A.; SINIGAGLIA-COIMBRA, R.; DE LA TORRE, L. G. et al. Structural characterization of β -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. *Food Research International*, 79, p. 95-105, 2016.

MIGUEL-JIMENEZ, S.; RIVERA DEL ALAMO, M. M.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; HIDALGO, C. O. et al. In vitro assessment of egg yolk-, soya bean lecithin- and liposome-based extenders for cryopreservation of dairy bull semen. *Anim Reprod Sci*, 215, p. 106315, Apr 2020.

MONTEIRO, M. S.; TORRES, M. A.; PASSARELLI, M. d. S.; MARTINS, M. P. et al. Impact of cryopreservation protocols (one- and two-step) on boar semen quality at 5 °C and post-thawing. *Animal Reproduction Science*, 247, p. 107093, 2022/12/01/ 2022.

MORAES, M.; CARVALHO, J. M. P.; SILVA, C. R.; CHO, S. et al. Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, n. 2, p. 274-282, 2013.

MORAES, M.; CARVALHO, J. M. P.; SILVA, C. R.; CHO, S.; SOLA, M. R.; PINHO, S. C. Liposomes encapsulating beta-carotene produced by the proliposomes method: characterisation and shelf life of powders and phospholipid vesicles. *International Journal of Food Science & Technology*, 48, n. 2, p. 274-282, 2013.

MORTAZAVI, S. H.; ESLAMI, M.; FARROKHI-ARDABILI, F. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. *Anim Reprod Sci*, 219, p. 106533, Aug 2020.

MORTAZAVI, S.-H.; ESLAMI, M.; FARROKHI-ARDABILI, F. Comparison of different carrier-compounds and varying concentrations of oleic acid on freezing tolerance of ram spermatozoa in tris-citric acid-egg yolk plasma semen diluent. *Animal Reproduction Science*, 219, p. 106533, 2020/08/01/ 2020.

NAJAFI, A.; KIA, H. D.; MEHDIPOUR, M.; HAMISHEHKAR, H. et al. Effect of quercetin loaded liposomes or nanostructured lipid carrier (NLC) on post-thawed sperm quality and fertility of rooster sperm. 152, p. 122-128, 2020.

NAJAFI, A.; TAHERI, R. A.; MEHDIPOUR, M.; FARNOOSH, G. et al. Lycopene-loaded nanoliposomes improve the performance of a modified Beltsville extender broiler breeder roosters. *Anim Reprod Sci*, 195, p. 168-175, Aug 2018.

NASAB, M. E.; TAKZAREE, N.; SAFFARI, P. M.; PARTOAZAR, A. In vitro antioxidant activity and in vivo wound-healing effect of lecithin liposomes: a comparative study. 8, n. 8, p. 633-643, 2019.

OKE, M.; JACOB, J.; PALIYATH, G. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. *Food Research International*, 43, p. 232-240, 01/31 2010.

OLDENHOF, H.; FRIEDEL, K.; SIEME, H.; GLASMACHER, B. et al. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. *Cryobiology*, 61, n. 1, p. 115-122, 2010/08// 2010.

ONDŘEJ, Š.; JIŘÍ, Š.; JAN, B.; PAVLA, M. P. et al. Low Density Lipoprotein - important player in increasing cryoprotective efficiency of soybean lecithin-based bull semen extenders. *Anim Reprod*, 16, n. 2, p. 267-276, Oct 23 2019.

PANG, Y. W.; SUN, Y. Q.; JIANG, X. L.; HUANG, Z. Q.; ZHAO, S. J.; DU, W. H.; HAO, H. S.; ZHAO, X. M.; ZHU, H. B. Protective effects of melatonin on bovine sperm characteristics and subsequent in vitro embryo development. *Mol Reprod Dev*, 83, n. 11, p. 993-1002, Nov 2016.

PARKS, J. E.; LYNCH, D. V. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology*, 29, n. 2, p. 255-266, Apr 1992.

PASCHOAL, A. F. L.; LUTHER, A. M.; JAKEL, H.; SCHEINPFLUG, K. et al. Determination of a cooling-rate frame for antibiotic-free preservation of boar semen at 5 degrees C. *PLoS One*, 15, n. 6, p. e0234339, 2020.

PEZO, F.; YESTE, M.; ZAMBRANO, F.; URIBE, P. et al. Antioxidants and their effect on the oxidative/nitrosative stress of frozen-thawed boar sperm. *Cryobiology*, 98, p. 5-11, Feb 2021.

PILLET, E.; LABBE, C.; BATELLIER, F.; DUCHAMP, G. et al. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. *Theriogenology*, 77, n. 2, p. 268-279, Jan 15 2012.

PURSEL, V. G.; SCHULMAN, L. L.; JOHNSON, L. A. Effect of Holding Time on Storage of Boar Spermatozoa At 5 C. *Journal of Animal Science*, 37, n. 3, p. 785-789, 1973.

QURESHI, M.; REHMAN, F.; KHAN, R. Effect of Soybean Based Extenders on Sperm Parameters of Holstein- Friesian Bull During Liquid Storage at 4°C. *Pakistan journal of zoology*, 46, p. 185-189, 02/01 2014.

RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; ESTRADA, E. Artificial Insemination in Boar Reproduction. In: BONET, S.; CASAS, I., et al (Ed.). *Boar Reproduction: Fundamentals and New Biotechnological Trends*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 589-607.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; MARTINEZ, E. A.; CALVETE, J. J.; PEÑA VEGA, F. J.; ROCA, J. Seminal Plasma: Relevant for Fertility? *International Journal of Molecular Sciences*, v.22, n. 9, DOI: 10.3390/ijms22094368.

RÖPKE, T.; OLDENHOF, H.; LEIDING, C.; SIEME, H. et al. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. *Theriogenology*, 76, n. 8, p. 1465-1472, 2011/11/01/ 2011.

SAAEELDIN, I. M.; KHALIL, W. A.; ALHARBI, M. G.; LEE, S. H. The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. *Animals: an open access journal from MDPI*, 10, n. 12, 12/03/2020 2020.

SARAVIA, F.; WALLGREN, M.; JOHANNISSON, A.; CALVETE, J. J. et al. Exposure to the seminal plasma of different portions of the boar ejaculate modulates the survival of spermatozoa cryopreserved in MiniFlatPacks. *Theriogenology*, 71, n. 4, p. 662-675, Mar 1 2009.

SCHMID, S.; HENNING, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W. F.; PETRUNKINA, A. M.; WABERSKI, D. The specific response to capacitating stimuli is a sensitive indicator of chilling injury in hypothermally stored boar spermatozoa. *Andrology*, 1, n. 3, p. 376-386, May 2013.

SHARAFI, M.; BORGHEI-RAD, S. M.; HEZAVEHEI, M.; SHAHVERDI, A. et al. Cryopreservation of Semen in Domestic Animals: A Review of Current Challenges, Applications, and Prospective Strategies. *Animals*, v.12, n. 23, DOI: 10.3390/ani12233271.

SHEN, T.; JIANG, Z. L.; LI, C. J.; HU, X. C. et al. Effect of alpha-lipoic acid on boar spermatozoa quality during freezing-thawing. *Zygote*, 24, n. 2, p. 259-265, Apr 2016.

SHEN, T.; JIANG, Z. L.; LIU, H.; LI, Q. W. Effect of *Salvia miltiorrhiza* polysaccharides on boar spermatozoa during freezing-thawing. *Anim Reprod Sci*, 159, p. 25-30, Aug 2015.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S. M.; DUARTE, V. G.; MACHADO, M. I.; MATOS, F. J. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J Ethnopharmacol*, 89, n. 2-3, p. 277-283, Dec 2003.

SILVA, N. C.; LEÃO, K. M.; PÁDUA, J. T.; MARQUES, T. C.; NETO, F. R. A.; DODE, M. A. N.; CUNHA, A. T. M. Effect of different cryopreservation extenders added with antioxidants on semen quality and in vitro embryo production efficiency in cattle. *An Acad Bras Cienc*, 93, n. 3, p. e20191229, 2021.

SOARES, S. L.; BRITO, C. R. C.; ANCIUTI, A. N.; GATTI, N. C. et al. Nanocarried antioxidants in freezing extenders for boar spermatozoa. *Andrologia*, 53, n. 10, p. e14199, Nov 2021.

SPJUTH, L.; JOHANNISSON, A.; LUNDEHEIM, N.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Early pre-pubertal exposure to low-dose oral di(2-ethylhexyl) phthalate does not affect sperm plasma membrane stability, acrosomal integrity or chromatin structure in the post-pubertal boar. *Theriogenology*, 68, n. 2, p. 186-195, 2007/07/15/ 2007.

STREMERSCH, S.; VANDENBROUCKE, R. E.; VAN WONTERGHEM, E.; HENDRIX, A. et al. Comparing exosome-like vesicles with liposomes for the functional cellular delivery of small RNAs. *J Control Release*, 232, p. 51-61, Jun 28 2016.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction*, 146, n. 1, p. R21-35, Jul 2013.

SUN, L.; HE, M.; WU, C.; ZHANG, S. et al. Beneficial Influence of Soybean Lecithin Nanoparticles on Rooster Frozen-Thawed Semen Quality and Fertility. *Animals (Basel)*, 11, n. 6, Jun 13 2021.

SZYMANOWICZ, J.; SCHWARZ, T.; MURAWSKI, M.; MAŁOPOLSKA, M.; OSZCZĘDA, Z.; TUZ, R.; NOWICKI, J.; BARTLEWSKI, P. M. Storage of boar semen at 16-18 °C in the long-term commercial extender prepared with deionized water or nanowater. *Anim Reprod*, 16, n. 4, p. 864-870, Nov 18 2019

TAOUZINET, L.; FATMI, S.; LAHIANI-SKIBA, M.; SKIBA, M. et al. Encapsulation Nanotechnology in Sperm Cryopreservation: Systems Preparation Methods and Antioxidants Enhanced Delivery. *Cryo Letters*, 42, n. 1, p. 1-12, Jan-Feb 2021.

TIZKAR, B.; KAZEMI, R.; ALIPOUR, A.; SEIDAVI, A. et al. Effects of dietary supplementation with astaxanthin and β -carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*). *Theriogenology*, 84, n. 7, p. 1111-1117, 2015/10/15/ 2015.

TOMÁS, C.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J.; GÓMEZ-IZQUIERDO, E.; DE MERCADO, E. Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*, 144, n. 3, p. 115-121, 2014/01/30/ 2014.

TORRES, M. A.; DIAZ, R.; BOGUEN, R.; MARTINS, S. M.; RAVAGNANI, G. M.; LEAL, D. F.; OLIVEIRA MDE, L.; MURO, B. B.; PARRA, B. M.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, J. A., Jr.; ALVARENGA, M. A.; MORETTI ADE, S.; SEPULVEDA, N.; DE ANDRADE, A. F. Novel Flow Cytometry Analyses of Boar Sperm Viability: Can the Addition of Whole Sperm-Rich Fraction Seminal Plasma to Frozen-Thawed Boar Sperm Affect It? *PLoS One*, 11, n. 8, p. e0160988, 2016.

TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; PASSARELLI, M. S.; PAPA, F. O. et al. The ideal holding time for boar semen is 24 h at 17 °C prior to short-cryopreservation protocols. *Cryobiology*, 86, p. 58-64, Feb 2019a.

TORRES, M. A.; MONTEIRO, M. S.; PASSARELLI, M. S.; PAPA, F. O. et al. The ideal holding time for boar semen is 24h at 17 degrees C prior to short-cryopreservation protocols. *Cryobiology*, 86, p. 58-64, Feb 2019b.

TORRES, M. A.; PEDROSA, A. C.; NOVAIS, F. J.; ALKMIN, D. V.; COOPER, B. R.; YASUI, G. S.; FUKUMASU, H.; MACHATY, Z.; DE ANDRADE, A. F. C. Metabolomic signature of spermatozoa established during holding time is responsible for differences in boar sperm freezability†. *Biology of Reproduction*, 106, n. 1, p. 213-226, 2022.

TORRES, M. A.; RAVAGNANI, G. M.; LEAL, D. F.; MARTINS, S. M.; MURO, B. B.; MEIRELLES, F. V.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA, J. A.; ALVARENGA, M. A.; MORETTI, A. S.; DE ANDRADE, A. F. Seminal plasma arising from the whole boar sperm-rich fraction increases the stability of sperm membrane after thawing. *J Anim Sci*, 94, n. 5, p. 1906-1912, May 2016.

TRZCINSKA, M.; BRYLA, M. Apoptotic-like changes of boar spermatozoa in freezing media supplemented with different antioxidants. *Pol J Vet Sci*, 18, n. 3, p. 473-480, 2015.

VALENCIA, J.; GÓMEZ, G.; LÓPEZ, W.; MESA, H.; HENAO, F. J. Relationship between HSP90a, NPC2 and L-PGDS proteins to boar semen freezability. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8, n. 1, p. 21, 2017/03/01 2017.

VALENCIA, J.; YESTE, M.; QUINTERO-MORENO, A.; NINO-CARDENAS, C. D. P.; HENAO, F. J. Relative content of Niemann-Pick C2 protein (NPC2) in seminal plasma, but not that of spermadhesin AQN-1, is related to boar sperm cryotolerance. *Theriogenology*, 145, p. 181-189, Mar 15 2020.

WABERSKI, D.; RIESENBECK, A.; SCHULZE, M.; WEITZE, K. F. et al. Application of preserved boar semen for artificial insemination: Past, present and future challenges. *Theriogenology*, 137, p. 2-7, 2019/10/01/ 2019.

WANG, P.; SHU, Z.; HE, L.; CUI, X.; WANG, Y.; GAO, D. The pertinence of expression of heat shock proteins (HSPs) to the efficacy of cryopreservation in HELAs. *Cryo Letters*, 26, n. 1, p. 7-16, Jan-Feb 2005.

WASILEWSKA, K.; FRASER, L. Boar variability in sperm cryo-tolerance after cooling of semen in different long-term extenders at various temperatures. *Animal Reproduction Science*, 185, p. 161-173, 2017/10/01/ 2017.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal Reproduction Science*, 60-61, p. 481-492, 2000/07/02/ 2000.

WM; A., J. L.; WEITZE, K. F.; FISER, P. et al. Storage of boar semen. *Animal reproduction science*, 62, n. 1-3, 08/18/2000 2000.

YÁNEZ-ORTIZ, I.; CATALÁN, J.; RODRÍGUEZ-GIL, J. E.; MIRÓ, J.; YESTE, M. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246, p. 106904, 2022/11/01/ 2022.

YESTE, M. Recent Advances in Boar Sperm Cryopreservation: State of the Art and Current Perspectives. *Reprod Domest Anim*, 50 Suppl 2, p. 71-79, Jul 2015.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85, n. 1, p. 47-64, Jan 1 2016.

YESTE, M. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. *Animal Reproduction*, 14, n. 1, p. 69-81, 2017.

YESTE, M.; ESTRADA, E.; RIVERA DEL ALAMO, M. M.; BONET, S. et al. The increase in phosphorylation levels of serine residues of protein HSP70 during holding time at 17 degrees C is concomitant with a higher cryotolerance of boar spermatozoa. *PLoS One*, 9, n. 3, p. e90887, 2014.

YESTE, M.; RODRIGUEZ-GIL, J. E.; BONET, S. Artificial insemination with frozen-thawed boar sperm. *Mol Reprod Dev*, 84, n. 9, p. 802-813, Sep 2017.

YESTE. Sperm cryopreservation update: Cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology*, 85, n. 1, 01/01/2016 2016.

YOKOTA, D.; MORAES, M.; PINHO, S. C. Characterization of lyophilized liposomes produced with non-purified soy lecithin: a case study of casein hydrolysate microencapsulation. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 29, p. 325–335., 2012.

ZHANG, S.-S.; HU, J.-H.; LI, Q.-W.; JIANG, Z.-L. et al. The cryoprotective effects of soybean lecithin on boar spermatozoa quality. *African Journal of Biotechnology*, 8 (22), 2009.