

UTILIZAÇÃO DE LIPOSSOMAS NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE SUÍNO

USE OF LIPOSOMES IN THE PROCESS OF SWINE SEMEN CRYOPRESERVATION

Clederson Schmitt^I 

Fernanda Dagmar Martins Krug^{II} 

Izani Bonel Acosta^{III} 

Carine Dahl Corcini^{IV} 

^I Instituto Federal Farroupilha - Frederico Westphalen, RS, Brasil. Doutor em Reprodução Animal. E-mail: schmittproducoes@gmail.com

^{II} Instituto Federal Farroupilha - Farroupilha, RS, Brasil. Doutora em Veterinária. E-mail: fernadadmkrug@gmail.com

^{III} Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. Doutora em Veterinária. E-mail: izanibonel@hotmail.com

^{IV} Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil. Doutora em Biotecnologia. E-mail: corcinicd@gmail.com

Resumo: O presente trabalho tem como objetivo analisar o uso de lipossomas e lecitina de soja no processo de criopreservação de sêmen, com foco na espécie suína. Pois a utilização do sêmen criopreservado na suinocultura representa 1% apenas, por causa dos danos que ocorrem durante o processo de criopreservação, no qual passa por três etapas antes de ocorrer o congelamento, com a diminuição da temperatura. Dessa forma, ocorrem 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. Diante 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. 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: Antioxidantes. Células Esperáticas. Fosfolipídios. Lecitina de soja.

Abstract: The present study aims to analyze the use of liposomes and soy lecithin in the process of semen cryopreservation, with a focus on the swine species. The use of cryopreserved semen in pig farming represents only 1%, due to the damages that occur during the cryopreservation process, which undergoes three stages before freezing, with a decrease in temperature. As a result, physical and chemical changes occur in the sperm, making them susceptible to serious damage caused by the cold. Furthermore, the reduction in

DOI: <https://doi.org/10.31512/vivencias.v20i40.986>

Submissão: 21-02-2023

Aceite: 12-04-2023



Esta obra está licenciada com uma Licença Creative Commons Atribuição-NãoComercial-SemDerivações 4.0 Internacional.

temperature leads to a change in fluid phase to gel phase, resulting in greater cellular dehydration, resulting from the removal of polar molecules from phospholipids, leading to functional changes. Therefore, new cryoprotectants and antioxidants are sought to reduce/repair the damage to pig sperm from the cooling process to the semen thawing process. Liposomes are highlighted, which are colloid vesicles composed of amphipathic lipids that, in excess water, aggregate to form spherical lipid bilayers with an aqueous internal compartment, and can carry antioxidants, ATP. However, they can be made from different phospholipids, from egg yolk to soy lecithin, and even the manufacturing process can be different. It is noted that the use of liposomes in the process of semen cryopreservation is an alternative to prevent/repair the damage that occurs to sperm during this process.

Keywords: Antioxidants. Spermatid cells. 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 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, 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 (Rodríguez-Gil; Estrada, 2013; Knox, 2015; 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 anfífilicos que em excesso de água se agregam formando bicamadas lipídicas e encerrando compartimentos aquosos (Balbino; Aoki *et al.*, 2013; Taouzin; 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 e analisar o uso de lipossomas e lecitina de soja no processo de criopreservação de sêmen, com foco na espécie suína.

Metodologia

Esta revisão metodológica tem como objetivo analisar o uso de lipossomas e lecitina de soja no processo de criopreservação de sêmen, com foco na espécie suína. Para isso, foram consultados os principais bancos de dados eletrônicos, como PubMed, Scopus, Web of Science, CAFE do Periódicos Capes e Sciencedirect. Foram utilizados termos de pesquisa como “lipossomas na criopreservação de sêmen suíno”, “lipossomas na criopreservação de sêmen” e “lecitina de soja na criopreservação de sêmen suíno” e “lecitina de soja na criopreservação de sêmen”.

A pesquisa foi refinada para o período de 2010 até o presente momento e os artigos selecionados foram em língua portuguesa e inglesa. Inicialmente, serão abordadas de forma resumida as principais alterações que ocorrem nos espermatozoides de suínos durante a criopreservação, seguido do 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 (WmM; 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 como desvantagem, é possuir baixa relação esterol/fosfolipídio, ocasionando uma maior sensibilidade ao frio quando comparado com outras espécies (Yeste; Rodriguez-Gil *et al.*, 2017; Paschoal; Luther *et al.*, 2020). 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.

Vantagens do uso dos Lipossomas:

Como eles 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; Taouzin; Fatmi *et al.*, 2021). Com isso, o processo de fabricação pode ocorrer de diversas maneiras, que vão da questão metodológica até o tipo de lipídio utilizado. E dentro desse processo, existe a possibilidade do uso de lipídios com vários comprimentos de cadeia acil, que gera um fosfolipídio comercial como: DSPC (18:0), DPPC (16:0), DMPC (14:0) ou DLPC (12:0) (Röpke; Oldenhof *et al.*, 2011). Mas os custos de aquisição desses fosfolipídios comerciais tornam-se as vezes inviáveis seu uso, com isso os mais utilizados são os fosfolipídios que podem ser extraídos da lecitina de soja ou não da gema de ovo (Michelon; *et al.*, 2016) ou ainda podemos produzir lipossomas a partir da gema do ovo, pois o mesmo possui o mesmo componente da lecitina ou ainda, a 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). Com essas vantagens, que são bastante exploradas nas pesquisas na área de alimentos, estudos recentes apontam que eles têm a capacidade de atuar como veículo para compostos hidrofóbicos e hidrofílicos (Moraes; Carvalho *et al.*, 2013). Com essa possibilidade, pesquisas apontam que há possibilidade de incorporar moléculas de adenosina trifosfato (ATP), lipídios exógenos (Mehdipour; Daghigh Kia *et al.*, 2017), e ainda podendo entregar nutrientes e drogas aos tecidos-alvo (Antimisari; Mourtas *et al.*, 2018; Mortazavi, S. H.; Eslami, M. *et al.*, 2020) com isso, estuda-se as possibilidades da incorporação deles no processo de criopreservação do sêmen em diversas espécies.

Diante dessas vantagens, o seu uso no processo de criopreservação seminal, os lipossomas conseguem incorporar moléculas de ATP e ainda lipídios exógenos na membrana dos espermatozoides (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). Com essas incorporações, podemos ter melhora de alguns parâmetros espermáticos como aumento na: motilidade total

e progressiva, viabilidade, integridade da membrana plasmática e atividade mitocondrial em espermatozoides de galos (Saadeldin; Khalil *et al.*, 2020b).

Como eles podem ser carreadores de lipídios, há a possibilidade do uso dos lipossomas carregados com lipídios, como a lecitina (Mehdipour; Daghigh Kia *et al.*, 2017), com isso possibilita a 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, é a possibilidade de encapsular outras moléculas e serem semissintético (Saadeldin; Khalil *et al.*, 2020b).

Também podem 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 (Röpke; Oldenhof *et al.*, 2011; Sullivan; Saez, 2013). Consequentemente, novas pesquisas surgem buscando empregar os lipossomas no processo de criopreservação do sêmen em diversas espécies. Em equinos como aditivos crioprotetores (Pillet, Elodie; *et al.*, 2012; Medina-León; Domínguez-Mancera *et al.*, 2019), 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).

Origem dos fosfolipídios usados na fabricação dos lipossomas:

Dentre esses trabalhos citados anteriormente encontramos um ponto que merece destaque, a origem dos fosfolipídios usados na fabricação dos lipossomas não é comum a todos. Sendo que alguns utilizam fosfolipídios comerciais e lipídios extraídos da membrana da cabeça do espermatozoide, ou seja, teremos um lipossoma de origem animal (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).

Como citado anteriormente, temos uma grande possibilidade de uso de fosfolipídios de origem animal, como a base da gema de ovo, da cabeça do espermatozoide, etc... Como o caso do uso de diluentes que são usados no processo de criopreservação do sêmen, produzidos a partir da gema de ovo apresenta inúmeras desvantagens. Como ocorrer uma ampla gama de variabilidade na composição da gema, o risco de transmissão de doenças e ainda a contaminação bacteriana, com isso podendo prejudicar a qualidade do sêmen (Anzar; Rajapaksha *et al.*, 2019b).

Além disso, podemos obter fosfolipídios de forma sintética, com isso podemos ter diferentes propriedades químicas e físicas (termofísica, comprimento de cadeia e saturação) que podem ajudar na crioproteção da célula espermática. Nesse sentido, Röpke; Oldenhof *et al.* (2011) avaliaram diferentes tipos de lipossomas na criopreservação seminal de bovinos, entre os compostos utilizados na fabricação dos lipossomas, destaque foram para o dioleoil-glicerofosfolina e dioleoil-glicerofosfoglicerol, que proporcionou maior sobrevivência pós-descongelamento e maior motilidade progressiva. 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 trabalhos utilizaram fosfolipídios de origem animal, forma sintética ou ambos juntos.

Mas como se tem a questão do não uso de produtos de origem animal, atualmente existe uma ânsia da busca do não uso de material de origem animal nos produtos que fazem parte do processo de criopreservação do sêmen, faz-se necessário explorar novas alternativas da obtenção de fosfolipídios de origem vegetal (El-Keraby; Osman *et al.*, 2010). Com isso, eles vêm sendo uma alternativa estudada no processo de fabricação de lipossomas e sua utilização no processo de criopreservação, por serem livres de contaminação quando comparamos aos de origem animal (Qureshi; Rehman *et al.*, 2014).

E dentro dessa busca de obtenção de fosfolipídios de origem vegetal para produção de lipossomas, a lecitina de soja vem apresentando resultados satisfatórios com a melhora da regeneração da membrana plasmática durante o processo de congelamento-descongelamento de espermatozoides de carneiro (Saadeldin; Khalil *et al.*, 2020b). No uso dela como agente crioprotetor de espermatozoides de bovinos, resultou um efeito protetor contra o estresse oxidativo durante a criopreservação e conseguiu preservar a motilidade e integridade da membrana plasmática (El-Keraby; Osman *et al.*, 2010).

Além da pesquisa com sêmen de bovinos, outras pesquisas com sêmen de suínos, carneiros, cães, veados e camelos (El-Keraby; Osman *et al.*, 2010; Anzar; Rajapaksha *et al.*, 2019a; Bustani; Baiee, 2021). O uso da lectina de soja, é por possuir 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). E um dos componentes da lecitina de soja, está a fosfatidilcolina, um fosfolipídio que apresenta os componentes semelhantes a gema do ovo, e traz um excelente potencial antioxidante (Judde; Villeneuve *et al.*, 2003).

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). Além disso ocorre grande variação nos extensores à base de lecitina usados em estudos anteriores, tornando difícil compará-los entre si, como o a quantidade de fosfatidilcolina utilizadas em experimentos anteriores (Hermansson, U.; Johannisson, A. *et al.*, 2021).

De acordo com Saadeldin, Khalil et al. (2020b), os lipossomas à base de fosfolipídios, como a fosfatidilserina, dioleoilfosfatidilcolina, fosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina e dimiristoilfosfocolina, juntamente com ácidos graxos saturados e insaturados, têm a capacidade de se fundir com a membrana plasmática do espermatozoide e reduzir os danos decorrentes do processo de congelamento-descongelamento. Quando usados no sêmen de 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, com isso prevenindo danos a célula espermática (Ropke; Oldenhof *et al.*, 2011). Já em sêmen de perus, ocorre uma incorporação de fosfolipídios nas membranas espermáticas (Long; Conn, 2012).

Além desses benefícios a célula espermática, os lipossomas conseguem atuar como carreadores de produtos, como os antioxidantes (Saadeldin; Khalil *et al.*, 2020b). Ajudando na prevenção dos efeitos negativos em células espermáticas de suínos que são 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) (Trzcińska; Bryła *et al.*, 2015; Gupta; Finelli *et al.*, 2021). Levando à peroxidação lipídica e a ocorrência de alterações do tipo apoptótica e oxidação do DNA (Fraser; Strzeżek *et al.*, 2014; Trzcińska; Bryła *et al.*, 2015).

Esse processo é decorrente do alto teor de ácidos graxos insaturados na membrana plasmática e número reduzido de mecanismos antioxidantes, os chamados ROS (Soares; Brito *et al.*, 2021). Além de apresentar uma menor relação de colesterol/fosfolipídios (Yeste; Rodríguez-Gil *et al.*, 2017). Diante desses problemas, o uso de lipossomas como carreadores de antioxidantes e de colesterol poderá ajudar na incorporação de fosfolipídios junto a membrana plasmática, deixando a membrana mais resistente aos danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio (ROS).

A adição de antioxidantes ao diluente é uma estratégia viável para minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo nos espermatozoides suínos, devido à sua menor concentração natural de antioxidantes em comparação aos espermatozoides de bovinos (Lee; Kim, 2018). Dentre os antioxidantes em estudo, o ácido rosmarínico tem demonstrado resultados promissores (Feng; Lv *et al.*, 2020), assim como diferentes carotenoides que têm sido utilizados com sucesso para proteger os espermatozoides suínos durante a criopreservação (Lee; Kim, 2018).

Os carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis encontrados em plantas, bactérias e fungos, com propriedades antioxidantes amplamente utilizadas na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (Kirti; Amita *et al.*, 2014; Tizkar; Kazemi *et al.*, 2015). Dentre os carotenoides, o β -caroteno é um membro importante da família, encontrado em diversas frutas e vegetais (Michelon; Mantovani; *et al.*, 2016). O β -caroteno possui atividade biológica relevante devido à sua capacidade de atuar como provitamina A, oferecendo benefícios potenciais à saúde, como fortalecimento do sistema imunológico e redução do risco de doenças degenerativas (Michelon; De Matos De Borba *et al.*, 2012). Adicionalmente, o β -caroteno demonstra um grande potencial antioxidante quando incorporado a 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

(Stremersch; Vandembroucke *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, atualmente estão 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/g (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).

Uma técnica frequentemente empregada nesse processo é a injeção de etanol, um solvente orgânico que é amplamente aceito em aplicações farmacológicas e de processamento de alimentos (Michelon; Mantovani; *et al.*, 2016). No entanto, é importante destacar que é necessário que ocorra a evaporação desse solvente orgânico, após a aplicação dos lipossomas aos espermatozoides, para evitar danos aos mesmos e preservar sua viabilidade.

Considerações finais

Embora a utilização de lipossomas na criopreservação de sêmen possa ser uma alternativa promissora para prevenir ou reparar danos nos espermatozoides durante esse processo, é importante ter cautela na sua aplicabilidade. É notável a variação nos resultados dos estudos disponíveis, que diferem em termos de fosfolipídios utilizados na fabricação, bem como nas metodologias adotadas. Portanto, mais pesquisas são necessárias para determinar a eficácia e a segurança desses lipossomas em diferentes condições e cenários de criopreservação de sêmen.

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.; 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.
- 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.

