

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



**Tese**

**Lipossomas e betacaroteno encapsulado na refrigeração do sêmen canino**

**Edenara Anastácio da Silva**

Pelotas, 2023

**Edenara Anastácio da Silva**

**Lipossomas e betacaroteno encapsulado na refrigeração do sêmen canino**

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: Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Coorientadora: Dra. Carine Dahl Corcini

Pelotas, 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação da Publicação

S586l Silva, Edenara Anastácio da

Lipossomas e betacaroteno encapsulado na refrigeração do sêmen canino [recurso eletrônico] / Edenara Anastácio da Silva ; Antonio Sergio Varela Junior, orientador ; Carine Dahl Corcini, coorientadora. — Pelotas, 2023.

76 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1.  $\beta$ -caroteno encapsulado. 2. Lipossomas. 3. Criopreservação. 4. Cinética espermática. 5. Citometria de fluxo. I. Varela Junior, Antonio Sergio, orient. II. Corcini, Carine Dahl, coorient. III. Título.

CDD 636.708242

**Edenara Anastácio da Silva**

**Lipossomas e betacaroteno encapsulado na refrigeração do sêmen canino**

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

Data da Defesa: 25/04/2023

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antonio Sergio Varela Junior (Orientador)  
Doutor em Aquicultura pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dra. Andreia Nobre Anciuti  
Doutora em Doutora em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Izani Bonel Acosta  
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Maria Eduarda Bicca Dode  
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

*In memorian* as vítimas em todos os níveis da pandemia de COVID-19

## **Agradecimentos**

Nesta etapa, na defesa da tese final gostaria de começar agradecendo quem me ensinou que a educação é um dos caminhos para a mudança de uma realidade, minha mãe, Maria. Agradeço a Euani, minha companheira/irmã e meu pilar nos últimos tempos.

Agradeço a todos os colegas e amigos que me acompanharam no processo de doutoramento, principalmente Izani, Duda, Ina e a melhor estagiária Nicole, vocês foram incríveis, principalmente, minha amiga de vida e colega acadêmica desde a graduação Fernanda. Esta tese é fruto do nosso trabalho, sem vocês nada seria possível. Agradeço não apenas a contribuição técnica, experimental e disponibilidade para trabalhar muitas horas, mas também a empatia e parceria incondicional.

Não posso deixar de ser grata aos responsáveis pelas sementes que precederam o sonho de fazer doutorado. Primeiramente, gostaria de expressar o quanto os professores são importantes na vida de um jovem, como uma aula ou uma conversa podem serem o início da fé, do acreditar em que pode haver algo mais e de que é possível. Muito obrigada aos meus eternos mestres, não os vou citar, porque são realmente muitos. Agradeço especialmente meu orientador Dr. Antonio Sergio e minha coorientadora Dra. Carine Corcini por acreditarem em mim, me oportunizarem pesquisar e aprender.

Agradeço ao universo, à Deus e a lemanjá.

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”

## **Resumo**

SILVA, Edenara Anastácio da. **Lipossomas e betacaroteno encapsulado na refrigeração do sêmen canino.** 2023. 76f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Atualmente estudos tem salientado manipulação de agentes estabilizadores de membrana, como os lipossomas de fosfatidilcolina de soja, considerado o sitio primário de dano durante a criopreservação, e implementando uso de antioxidantes, como carotenoides, visando minimizar o estresse oxidativo. No primeiro experimento objetivou a avaliação da biocompatibilidade de 4 lipossomas contendo 45% (S45), 75% (S75), mais que 98% (S100) de fosfatidilcolina de soja e  $\beta$ -caroteno encapsulado em S45 (SCAR), em dois diluentes bases TRIS-glicose e plasma de gema de ovo e as possíveis concentrações de uso. Avaliou-se a cinética espermática do sêmen canino refrigerado a 5°C pelo sistema automatizado (CASA), após a curva de resfriamento em 3h, e após 24h, 48h, 72h e 96h de refrigeração. O plasma de gema de ovo demonstrou-se superior na manutenção dos parâmetros de motilidade em 72h e maior biocompatibilidade com os lipossomas ( $p < 0,05$ ). Os lipossomas S75 e SCAR na concentração de 1,25mM foram mais eficientes na manutenção da motilidade progressiva, parâmetros de distância, velocidade, retilinearidade, linearidade, coeficiente de oscilação, movimentação da cabeça e flagelar do sêmen canino refrigerado. No segundo experimento S45, S75, S100 e SCAR foram estudados, como aditivos, na refrigeração do sêmen canino a 5°C por até 4 dias, nas concentrações de 5mM; 1,25mM e 0,5mM. com avaliações após 24h, 48h, 72h e 96h. Cinética foi avaliada através do sistema automatizado (CASA) e os parâmetros de integridade e funcionalidade celular através de citometria de fluxo. O uso de lipossomas de fosfatidilcolina de soja e  $\beta$ -caroteno encapsulado diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular do sêmen canino refrigerado ( $p < 0,05$ ). A concentração de 0,5mM do lipossoma S75 possibilitou as maiores médias de motilidade total e progressiva dos meios estudados neste experimento ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente 0,5mM de SCAR obteve motilidade progressiva, velocidade retilinearidade e linearidade superior ao meio controle ( $p < 0,05$ ).

**Palavras-chave:**  $\beta$ -caroteno encapsulado; lipossomas; criopreservação; cinética espermática; citometria de fluxo

## **Abstract**

SILVA, Edenara Anastácio da. **Liposomes and encapsulated beta-carotene in chilled canine semen.** 2023. 76f. Thesis (Doctor in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

Currently, studies have highlighted manipulation of membrane stabilizing agents, such as soy phosphatidylcholine liposomes, considered the primary site of damage during cryopreservation, and implementing the use of antioxidants, such as carotenoids, in order to minimize oxidative sperm stress. The first experiment aimed to evaluate the biocompatibility of 4 liposomes containing 45% (S45), 75% (S75), more than 98% (S100) of soy phosphatidylcholine and β-carotene encapsulated in S45 (SCAR), in two base diluents TRIS-glucose and egg yolk plasma and possible concentrations of use. The sperm kinetics of canine semen refrigerated at 5°C by the automated system (CASA) was evaluated after the cooling curve at 3h, 24h, 48h, 72h and 96h of refrigeration. Egg yolk plasma was shown to be superior in maintaining motility parameters at 72h and greater biocompatibility with liposomes ( $p < 0.05$ ). Liposomes S75 and SCAR at a concentration of 1.25mM were more efficient in maintaining progressive motility, distance parameters, velocity, straightness, linearity, oscillation coefficient, head and flagellar movement of refrigerated canine semen. In the second experiment S45, S75, S100 and SCAR were studied, as additives, in canine semen refrigeration at 5°C for up to 4 days, in concentrations of 5mM; 1.25mM and 0.5mM. with evaluations after 24h, 48h, 72h and 96h. Kinetics were evaluated using the automated system (CASA) and parameters of cell integrity and functionality using flow cytometry. The use of soy phosphatidylcholine liposomes and encapsulated β-carotene decreased the production of intracellular reactive oxygen species in refrigerated canine semen ( $p < 0.05$ ). The concentration of 0.5mM of liposome S75 allowed the highest means of total and progressive motility of the media studied in this experiment ( $p < 0.05$ ). Additionally, 0.5mM of SCAR obtained progressive motility, speed, straightness and linearity superior to the control medium ( $p < 0.05$ ).

**Keywords:** encapsulated β-carotene; liposomes; sperm kinetics; flow cytometry; canine semen

## **Lista de Tabelas**

### **Artigo 1**

Tabela 1	Caracterização diâmetro médio (Dh), índice de polidispersividade (IPd), Potencial- $\zeta$ e pH dos diferentes lipossomas.....	28
Tabela 2	Motilidade progressiva (MP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações (mM) testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	31
Tabela 3	Tabela 3. Médias dos valores de motilidade progressiva (MP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	32
Tabela 4	Médias de motilidade espermática total (MT) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	36
Tabela 5	Médias de motilidade progressiva (MP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	36
Tabela 6	Médias dos valores de distância média da trajetória (DAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	36

Tabela 7	Médias dos valores de distância curvilínea (DCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	36
Tabela 8	Médias dos valores de distância linear progressiva (DSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	37
Tabela 9	Médias dos valores de velocidade média da trajetória (VAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	37
Tabela 10	Médias dos valores de velocidade curvilínea (VCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	37
Tabela 11	Médias dos valores de velocidade linear progressiva (VSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	37
Tabela 12	Médias dos valores de retilinearidade (STR) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	38
Tabela 13	Médias dos valores de linearidade (LIN) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	38
Tabela 14	Médias dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	38

Tabela 15	Médias dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL)....	38
Tabela 16	Médias dos valores de frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL)....	39
Tabela 17	Médias dos valores de motilidade total (MT) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	39
Tabela 18	Médias dos valores de distância média da trajetória (DAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	39
Tabela 19	Médias dos valores de distância curvilínea (DCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	39
Tabela 20	Médias dos valores de distância linear progressiva (DSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	40
Tabela 21	Médias dos valores de velocidade média da trajetória (VAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	40
Tabela 22	21. Médias dos valores de velocidade curvilínea (VCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	40

Tabela 23	Médias dos valores de velocidade linear progressiva (VSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	40
Tabela 24	Médias dos valores de retilinearidade (STR) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	41
Tabela 25	Médias dos valores de linearidade (LIN) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	41
Tabela 26	Médias dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	41
Tabela 27	Médias dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL)....	41
Tabela 28	Médias dos valores de frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL)....	42
Tabela 29	Médias dos valores de motilidade total (MT) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	42
Tabela 30	Médias dos valores de motilidade progressiva (MP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	42

Tabela 31	Médias dos valores de distância média da trajetória (DAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	42
Tabela 32	Médias dos valores de distância curvilínea (DCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	43
Tabela 33	. Médias dos valores de distância linear progressiva (DSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	43
Tabela 34	Médias dos valores de velocidade média da trajetória (VAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	43
Tabela 35	Médias dos valores de velocidade curvilínea (VCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	43
Tabela 36	Médias dos valores de velocidade linear progressiva (VSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	44
Tabela 37	Médias dos valores de retilinearidade (STR) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	44
Tabela 38	Médias dos valores de linearidade (LIN) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	44

Tabela 39	Médias dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	44
Tabela 40	Médias dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL)....	45
Tabela 41	Médias dos valores de frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL)....	45
Tabela 42	Médias dos valores de motilidade total (MT) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	45
Tabela 43	Médias dos valores de distância média da trajetória (DAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	45
Tabela 44	Médias dos valores de distância curvilínea (DCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	46
Tabela 45	Médias dos valores de distância linear progressiva (DSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	46
Tabela 46	Médias dos valores de velocidade média da trajetória (VAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	46

Tabela 47	Médias dos valores de velocidade curvilínea (VCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	46
Tabela 48	Médias dos valores de velocidade linear progressiva (VSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	47
Tabela 49	Médias dos valores de retilinearidade (STR) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	47
Tabela 50	Médias dos valores de linearidade (LIN) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	47
Tabela 51	Médias dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	47
Tabela 52	Médias dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).....	48
Tabela 53	Médias dos valores de frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL)...	48

## Artigo 2

Tabela 1	Diâmetro médio (D <sub>h</sub> ), índice de polidispersividade (IPd), Potencial- $\zeta$ e pH dos lipossomas.....	51
----------	---	----

Tabela 2	Tabela 2. Médias ( $\pm$ D.P.M.) da motilidade espermática total do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	55
Tabela 3	Tabela 3. Médias ( $\pm$ D.P.M.) da motilidade progressiva do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.	55
Tabela 4	Tabela 4. Médias ( $\pm$ D.P.M.) da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	55
Tabela 5	Médias ( $\pm$ D.P.M.) da distância média da trajetória (DAP) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	59
Tabela 6	Médias ( $\pm$ D.P.M.) da distância curvilínea do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	59
Tabela 7	Médias ( $\pm$ D.P.M.) da distância linear progressiva (DSL) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	59
Tabela 8	Médias ( $\pm$ D.P.M.) da velocidade média da trajetória (VAP) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	59
Tabela 9	Médias ( $\pm$ D.P.M.) da velocidade curvilínea (VCL) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	59
Tabela 10	Médias ( $\pm$ D.P.M.) velocidade linear progressiva (VSL) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	60
Tabela 11	Médias ( $\pm$ D.P.M.) de retilinearidade (STR) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	60
Tabela 12	Médias ( $\pm$ D.P.M.) da linearidade (LIN) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	60
Tabela 13	Médias ( $\pm$ D.P.M.) dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	60

Tabela 14	Médias ( $\pm$ D.P.M.) dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	60
Tabela 15	Médias ( $\pm$ D.P.M.) da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.....	61
Tabela 16	Médias ( $\pm$ D.P.M.) dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).....	61
Tabela 17	Médias( $\pm$ D.P.M.) de reação acrossomal (ACRO) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).....	61
Tabela 18	Médias ( $\pm$ D.P.M.) da fluidez de membrana (FLU) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).....	61
Tabela 19	Médias ( $\pm$ D.P.M.) do índice de fragmentação de DNA (DFI) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).....	61
Tabela 20	Médias ( $\pm$ D.P.M.) da funcionalidade mitocondrial (MIT) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).....	62
Tabela 21	Médias ( $\pm$ D.P.M.) ruptura celular do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).....	62

## **Sumário**

<b>1 Introdução.....</b>	<b>17</b>
<b>2 Artigos.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Artigo 1.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Artigo 2.....</b>	<b>49</b>
<b>2.3 Artigo 3.....</b>	<b>63</b>
<b>3 Considerações Finais.....</b>	<b>71</b>
<b>Referências.....</b>	<b>72</b>

## **1 Introdução**

Com a aproximação sentimental do homem com os cães, advento da cinofilia, e interesse no desenvolvimento de biotécnicas para carnívoros silvestres, é necessária a descrição de métodos eficientes para a criopreservação seminal da espécie, além dos cães serem modelo científico para testes em outras espécies.

A criopreservação visa manter a funcionalidade e viabilidade espermática através de processos sequenciais de redução da temperatura (Woods, 2004). Possibilita a utilização de ejaculados por períodos relativamente longos (refrigeração), reduzindo riscos e custos com a aquisição de reprodutores, além de facilitar o transporte de material genético (De Souza Castelo; Frota; Silva, 2008). No entanto, o processo expõe os espermatozoides ao choque térmico e crioinjúrias, danos estruturais e funcionais devido à redução da temperatura, além de estresse químico e oxidativo, diminuindo a capacidade fertilizante dos gametas (Watson; Morris, 1987).

Atualmente estudos tem salientado manipulação de agentes estabilizadores de membrana, considerado o sitio primário de dano durante a criopreservação (Quinn, 1985). A diminuição da temperatura leva a alterações estruturais e organizacionais na membrana plasmática, que passa de uma fase fluida para gel devido a remoção de moléculas de água dos grupos polares (cabeça) dos fosfolipídios (Oldenhof *et al.*, 2010). Adicionalmente, o estresse oxidativo induz a formação de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou compostos que contém radicais livres (RL), resultando em perda do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante (Guthrie; Welch, 2012).

Na preservação de sêmen canino, a gema de ovo é tradicionalmente utilizada como estabilizadora de membrana, ação atribuída à lipoproteína de baixa densidade (LDL), contudo a presença de grânulos, minerais e compostos como lipoproteína de alta densidade, inibem a respiração celular causando prejuízos à viabilidade espermática (Pace; Graham, 1974).

Estudos demonstraram a eficiência do uso da LDL purificada na criopreservação de sêmen canino (Varela Junior *et al.*, 2009; Belala *et al.*, 2016a), porém a técnica demonstra-se inviável devido ao longo e laborioso processo de purificação.

Neste contexto, o uso alternativo do plasma de gema de ovo (PL), que é a fração solúvel obtida através da simples diluição e centrifugação do Tris-gema (Laca *et al.*, 2015), demonstra-se como excelente substituto ao uso do Tris-gema, devido à presença da LDL, para proteção espermática durante a criopreservação do sêmen canino (Belala *et al.*, 2016a; Corcini *et al.*, 2016).

O efeito crioprotetor da LDL durante o resfriamento se deve principalmente interação das micelas na membrana plasmática dos espermatozoides, com influxo de fosfolipídios e colesterol na membrana celular (Bergeron *et al.*, 2004), formação de interface entre ácidos graxos e água (Anton *et al.*, 2003), além de formar complexos com proteínas do plasma seminal, evitando a ação deletéria destas sobre as membranas (Manjunath *et al.*, 2002). Adicionalmente, Graham e Foote (1987) demonstraram que a fosfatilserina e fosfatidilcolina são os fosfolipídios da gema de ovo mais eficientes na crioproteção espermática em sêmen de touros, propondo a reposição dos lipídeos de membrana e diminuindo os efeitos de transição de fase com a adição destes fosfolipídios em diluentes.

Apesar do amplo uso da gema de ovo em diluentes de criopreservação seminal de cães, existem limitações sanitárias, como risco de contaminação bacteriana e potencial desenvolvimento de doenças, além da variabilidade de sua composição, o que dificulta a padronização dos diluentes (Hermannsson; Johannisson; Axner, 2021). Estudos recentes na criopreservação de sêmen canino estão focados na busca de alternativas ao uso da gema de ovo e seus subprodutos, visando o uso de outros componentes estabilizantes de membrana como lipossomas (LIPO) e substâncias sintéticas que mimetizem os efeitos da LDL (Bencharif; Dordas-Perpinya, 2020).

LIPO são vesículas coloidais compostas de lipídeos anfipáticos que em excesso de água se agregam formando bicamadas lipídicas esféricas com compartimento interno aquoso (Balbino *et al.*, 2013). Estas nanoestruturas possuem inúmeras vantagens em relação a LDL, com possibilidade de encapsular outras moléculas, ser semi-sintético, quimicamente definido e facilmente esterilizado e produzido para uso em diluentes seminais (Saadeldin *et al.*, 2020).

A transição da fase do estado físico da membrana espermática de fluida para gel durante a criopreservação é altamente dependente da composição de lipídios das membranas e, portanto, a fusão ou associação espontânea de LIPO facilita a transferência de lipídios e colesterol, o que leva a rearranjo dos componentes da membrana celular e modifica as propriedades físico-químicas da membrana, melhorando assim a criotolerância dos espermatozoides (Ropke *et al.*, 2011; Sullivan; Saez, 2013). O efeito sobre as membranas é estritamente relacionado as propriedades físicas e químicas dos componentes e estrutura do LIPO (Zeron *et al.*, 2002; Purdy; Graham, 2014).

O uso de LIPO compostas de fosfatidilcolina comerciais extraída da gema de ovo tem-se demonstrado como alternativas ao uso de LDL na criopreservação de sêmen de touros (Zeron *et al.*, 2002; Ropke *et al.*, 2011), garanhões (Pillet *et al.*, 2012) e cães em concentrações entre 2 e 6mM de LIPO (Belala *et al.*, 2016a; Belala *et al.*, 2016b). Na refrigeração de sêmen de perus, o uso de LIPO composta de fosfatidilcolina extraída de gema de ovo marcada com fluorocromos, demonstraram através da análise de citometria de fluxo a incorporação deste fosfolipídios nas membranas espermáticas, com consequente aumento de fertilidade *in vivo* através de inseminação artificial (Long; Conn, 2012).

Com intuito da introdução de um estabilizador de membrana de origem vegetal, lecitinas de soja comerciais em diferentes apresentações e métodos de adição aos diluentes têm sido utilizadas em estudos na criopreservação de seminal de cães com resultados promissores, em concentrações variando de 1mg/mL a 10 mg/mL ( Beccaglia; Anastasi; Luvoni, 2009; Axnér; Lagerson, 2016; Sánchez-Calabuig *et al.*, 2017; Dalmazzo *et al.*, 2018; Hermansson; Johannsson; Axner, 2021). Porém, lecitinas de soja de diferentes fontes contém diferentes fosfolipídios e concentrações, e o método de preparo e adição ao diluente afetam os resultados (De Paz *et al.*, 2010). Analiticamente demonstra-se a necessidade de estudos mais aprofundados afim de, determinar a concentração ideal de fosfatidilcolina de soja, padronização do método de adição aos diluentes de criopreservação seminal de cães, bem como análises mais aprofundadas de viabilidade e funcionalidade espermática (Hermansson; Johannsson; Axner, 2021).

Outro linha de estudo visando melhoria na criopreservação espermática, foca o desenvolvimento de aditivos antioxidantes para diluentes com intuito de diminuir a produção ou neutralizar ROS (Petruska; Capcarova; Sutovsky, 2014). O choque

térmico e a interação com oxigênio atmosférico, aumenta a produção de ROS, e leva ao desequilíbrio entre radicais livres e dos antioxidantes presentes no sêmen (Medeiros *et al.*, 2002). Devido ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados na membrana e poucas defesas antioxidantes, os espermatozoides são altamente sensíveis ao estresse oxidativo (Jones; Mann; Sherins, 1979; Gavella; Lipovac, 1992; Griveau; Le Lannou, 1997) . Altas taxas de ROS, elevam o a lipoperoxidação das membranas, inativam enzimas glicolíticas e levam os espermatozoides à capacitação, em níveis extremos à deterioração espermática (Alvarez; Storey, 1993; Leclerc; De Lamirande; Gagnon, 1997).

A suplementação de antioxidantes em diluentes de criopreservação em cães podem melhorar a qualidade espermática após o descongelamento (Qamar *et al.*, 2020). Antioxidantes podem remover as ROS e neutralizar seus efeitos protegendo a membrana plasmática da peroxidação lipídica (Lee; Kim, 2018).

Carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis produzidos em plantas, bactérias e fungos possuem propriedades antioxidantes utilizadas nas industriais alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (Kirti *et al.*, 2014). O uso de diferentes carotenoides tem demonstrado efeitos antioxidantes com eficiente manutenção da viabilidade espermática após a criopreservação em cães (Qamar *et al.*, 2020; Sheikholeslami *et al.*, 2020), suínos (Lee; Kim, 2018), galos (Mehdipour *et al.*, 2020; Najafi *et al.*, 2020), carneiros (Fang *et al.*, 2015) e touros (Farzan; Chamani; Varnaseri, 2014).

O uso de  $\beta$ -caroteno na suplementação oral e avaliação de sêmen em grilos (Almbro; Dowling; Simmons, 2011), peixes (Tizkar *et al.*, 2015) e Anfíbios (Keogh; Byrne; Silla, 2018) não observarão efeitos relacionados à reprodução. Conduto, em homem inférteis foi associada positivamente com taxas de fertilização *in vitro* através de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (Li *et al.*, 2019). Adicionalmente a inclusão de  $\beta$ -caroteno como aditivo incluso diretamente em diluente seminal de congelamento de trutas não demonstrou efeitos (Kutluyer *et al.*, 2014). Os pesquisadores Michelon *et al.* (2016) desenvolveram um sistema de encapsulamento de  $\beta$ -caroteno em LIPO de lecitina de soja com capacidade de inibição de peroxidação lipídica. Produzindo desta forma, a possibilidade de empregabilidade destes LIPO como carreadores de  $\beta$ -caroteno como aditivos em diluentes celulares.

A hipótese deste trabalho é de que LIPO compostos de fosfatidilcolina de soja, em diferentes concentrações, e  $\beta$ -caroteno encapsulado podem agir como crioprotetores estabilizadores de membrana plasmática e antioxidantes durante o resfriamento do sêmen canino, resultando em maior eficiência na manutenção da qualidade espermática. Para este estudo, no primeiro experimento realizado objetivou-se verificar a citotoxicidade e a melhor concentração de quatro LIPO, em dois diluentes comumente utilizados, na manutenção de parâmetros de cinética espermática do sêmen canino refrigerado. Após a avaliação da biocompatibilidade das concentrações dos diferentes lipossomos, foram analisados parâmetros de cinética e funcionalidade espermática dos gametas preservados por até quatro dias sob refrigeração, afim de determinar a melhor concentração e proporção da composição dos LIPO e  $\beta$ -caroteno encapsulados.

## **2 Artigos**

### **2.1 Artigo 1**

#### **Efeitos de lipossomas de lecitina de soja e $\beta$ -caroteno encapsulado na cinética do sêmen canino resfriado**

Edenara Anastácio da Silva<sup>1</sup>; Carine Dahl Corcini<sup>1-3</sup>; Fernanda Rodriguez Mendoça<sup>1</sup>; Izani Acosta Bonel<sup>1</sup>; Maria Eduarda Bicca Dode<sup>1</sup>; Nicole Freitas Conçalves<sup>1</sup>; Rodrigo Desessards Jardim<sup>3</sup>; Cristiana Lima Dora<sup>3</sup>; Mariano Michelon<sup>2</sup>; Antonio Sergio Varela Junior<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil

<sup>2</sup>Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil

<sup>3</sup>Reprodução Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil

Será submetido à revista *Observatorio de la Economía Latinoamericana*

**Efeitos de lipossomas de lecitina de soja e  $\beta$ -caroteno encapsulado na cinética do sêmen canino resfriado**

**Effects of soy lecithin liposomes and encapsulated  $\beta$ -carotene on the kinetics of cooled canine semen**

**Efectos de liposomas de lecitina de soja y  $\beta$ -caroteno encapsulados en cinética del semen canino resfriado**

**Edenara Anastácio**

Mestre em Ciências Animais

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: edenara\_anastacio@hotmail.com

**Carine Dahl Corcini**

Doutora em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: corcinicd@gmail.com

**Fernanda Rodriguez Mendoça**

Mestre em Ciências Animais

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: nandarm.vet@gmail.com

**Izani Acosta Bonel**

Doutora em Ciências

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: izanibonel@hotmail.com

**Maria Eduarda Bicca Dode**

Doutora em Ciências

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: dudadode@hotmail.com

**Cristiana Lima Dora**

Doutora em Farmácia

Instituição: Universidade Federal de Rio Grande (FURG)

Endereço: Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: cristianadora@gmail.com

**Mariano Michelon**

Doutor em Engenharia de Alimentos

Instituição: Universidade Federal de Rio Grande (FURG)

Endereço: Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: michelonmariano@gmail.com

**Antonio Sergio Varela Junior**

Doutor em Aquicultura

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: varelajras@gmail.com

**RESUMO**

A criopreservação é uma biotecnologia essencial para a preservação do material genético de machos de diversas espécies. Atualmente estudos tem salientado manipulação de agentes estabilizadores de membrana, considerado o sitio primário de dano durante a criopreservação, e implementando uso de antioxidantes, como carotenoides, visando minimizar o estresse oxidativo. Com intuito da introdução de um estabilizador de membrana de origem vegetal, lecitinas de soja comerciais em diferentes apresentações e métodos de adição aos diluentes têm sido utilizadas em estudos na criopreservação de seminal. Visto isso este estudo objetivou a avaliação da biocompatibilidade de 4 diferentes lipossomas contendo 45% (S45), 75% (S75), mais que 98% (S100) de fosfatidilcolina de soja e  $\beta$ -caroteno encapsulado em S45 (SCAR), em dois diluentes bases TRIS-glicose e plasma de gema de ovo (EYP) e as possíveis concentrações de uso. Avaliou-se a cinética espermática do sêmen canino refrigerado a 5°C por até 4 dias. A cinética espermática foi realizada pelo sistema automatizado (CASA) no sêmen diluído nos tratamentos após a curva de resfriamento em 3h, 24h, 48h, 72h e 96h de refrigeração. O plasma de gema de ovo demonstrou-se superior na manutenção dos parâmetros de motilidade em 72h ( $p < 0,05$ ). A biocompatibilidade dos lipossomas foi superior com o uso do plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Os lipossomas S75 e SCAR na concentração de 1,25mM foram mais eficientes na manutenção da motilidade progressiva, parâmetros de distância, velocidade, retilinearidade, linearidade, coeficiente de oscilação, movimentação da cabeça e flagellar do sêmen canino refrigerado por 4 dias.

**Palavras-chave:**  $\beta$ -caroteno encapsulados, Lipossomas, Resfriamento, Sêmen Canino, Cinética Espermática.

**ABSTRACT**

Cryopreservation is an essential biotechnology for the preservation of genetic material from males of several species. Current studies have highlighted the manipulation of membrane stabilizing agents, considered the primary site of damage during cryopreservation, and the implementation of the use of antioxidants, such as carotenoids, to minimize oxidative stress. With the aim of introducing a membrane stabilizer of plant origin, commercial soy lecithins in different presentations and methods of addition to diluents have been used in studies on seminal cryopreservation. In view of this, this study aimed to evaluate the biocompatibility of four different liposomes containing 45% (S45), 75% (S75), more than 98% (S100) of soy phosphatidylcholine and  $\beta$ -carotene encapsulated in S45 (SCAR), in two diluents based on TRIS-glucose and egg yolk plasma (EYP) and the possible concentrations of use. The sperm kinetics of canine semen refrigerated at 5°C for up to 4 days were evaluated. Sperm kinetics

were performed by the automated system (CASA) on semen diluted in the treatments after the cooling curve in 3h, 24h, 48h, 72h and 96h of refrigeration. Egg yolk plasma was superior in maintaining motility parameters in 72h ( $p < 0.05$ ). The biocompatibility of liposomes was superior with the use of egg yolk plasma ( $p < 0.05$ ). S75 and SCAR liposomes at a concentration of 1.25mM were more efficient in maintaining progressive motility, distance parameters, speed, straightness, linearity, oscillation coefficient, head and flagellar movement of canine semen refrigerated for 4 days.

**Keywords:** Encapsulated  $\beta$ -carotene, Liposomes, Cooling, Canine Semen, Sperm Kinetics.

## RESUMEN

La criopreservación es una biotecnología esencial para la preservación del material genético de machos de diversas especies. Estudios actuales han destacado la manipulación de agentes estabilizadores de membrana, considerados el principal sitio de daño durante la criopreservación, y la implementación del uso de antioxidantes, como los carotenoides, para minimizar el estrés oxidativo. Con el objetivo de introducir un estabilizador de membrana de origen vegetal, se han utilizado lecitinas de soya comerciales en diferentes presentaciones y métodos de adición a diluyentes en estudios sobre criopreservación seminal. En vista de esto, este estudio tuvo como objetivo evaluar la biocompatibilidad de cuatro liposomas diferentes que contienen 45% (S45), 75% (S75), más del 98% (S100) de fosfatidilcolina de soya y  $\beta$ -caroteno encapsulados en S45 (SCAR), en dos diluyentes a base de TRIS-glucosa y plasma de yema de huevo (EYP), y las posibles concentraciones de uso. Se evaluó la cinética espermática del semen canino refrigerado a 5 °C durante un máximo de 4 días. La cinética espermática se realizó mediante el sistema automatizado (CASA) en semen diluido en los tratamientos después de la curva de enfriamiento en 3 h, 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de refrigeración. El plasma de yema de huevo fue superior en el mantenimiento de los parámetros de motilidad en 72 h ( $p < 0,05$ ). La biocompatibilidad de los liposomas fue superior con el uso de plasma de yema de huevo ( $p < 0,05$ ). Los liposomas S75 y SCAR a una concentración de 1,25 mM fueron más eficientes en el mantenimiento de la motilidad progresiva, los parámetros de distancia, la velocidad, la rectitud, la linealidad, el coeficiente de oscilación, el movimiento de la cabeza y el flagelar del semen canino refrigerado durante 4 días.

**Palabras clave:**  $\beta$ -caroteno encapsulado, liposomas, enfriamiento, semen canino, cinética espermática.

## 1 INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma biotecnologia que visa a preservação do material genético de machos de diversas espécies (Ezzati *et al.*, 2020). Possibilita a utilização de ejaculados por períodos relativamente longos (refrigeração), reduzindo riscos e custos com a aquisição de reprodutores, além de facilitar o transporte de material genético (De Souza Castelo; Frota; Silva, 2008).

O objetivo da criopreservação é manter a funcionalidade e viabilidade espermática através de processos sequenciais de redução da temperatura (Woods, 2004). No entanto, durante o desenvolvimento da técnica, os espermatozoides sofrem diversos efeitos negativos e estresses (físicos, químicos, osmóticos e oxidativos) (Amidi *et al.*, 2016; Ezzati *et al.*, 2020). A diminuição da temperatura leva a alterações estruturais e organizacionais na membrana

plasmática, que passa de uma fase fluida para gel devido a remoção de moléculas de água dos grupos polares (cabeça) dos fosfolipídios, com isso há perda de funções como permeabilidade seletiva e capacidade fertilizante (Oldenhof *et al.*, 2010).

Atualmente estudos tem salientado manipulação de agentes estabilizadores de membrana, considerado o sitio primário de dano durante a criopreservação (Quinn, 1985). O uso de antioxidantes visando minimizar o estresse oxidativo dos espermatozoides tem sido estudado em diversas espécies. No entanto o uso deste apresentam algumas limitações, como baixa durabilidade, solubilidade e estabilidade em meios aquosos (Martinelli *et al.*, 2020). Michelon *et al.* (2016) desenvolveram um sistema de encapsulamento de  $\beta$ -caroteno em lipossomas de lecitina de soja com capacidade de inibição de peroxidação lipídica. Produzindo desta forma, a possibilidade de empregabilidade destes LIPO como carreadores de  $\beta$ -caroteno como aditivos em diluentes celulares.

Lipossomas são vesículas coloidais compostas de lipídeos anfipáticos que em excesso de água se agregam formando bicamadas lipídicas esféricas com compartimento interno aquoso (Balbino *et al.*, 2013). Com intuito da introdução de um estabilizador de membrana de origem vegetal, lecitinas de soja comerciais em diferentes apresentações e métodos de adição aos diluentes têm sido utilizadas em estudos na criopreservação de seminal de cães com resultados promissores, em concentrações variando de 1mg/mL a 10 mg/mL (Beccaglia; Anastasi; Luvoni, 2009; Axnér, 2016; Sánchez-Calabuig *et al.*, 2017; Dalmazzo *et al.*, 2018; Hermansson; Johannesson; Axner, 2021).

Porém, lecitinas de soja de diferentes fontes contém diferentes fosfolipídios e concentrações, e o método de preparo e adição ao diluente afetam os resultados (De Paz *et al.*, 2010). O objetivo desse estudo foi avaliar verificar a citotoxicidade e determinar a melhor concentração e proporção da composição dos lipossomas e  $\beta$ -caroteno encapsulados, em dois diluentes comumente utilizados, na manutenção de parâmetros de cinética espermática do sêmen canino refrigerado.

## **2 METODOLOGIA**

### *Produção dos lipossomas*

Para produção dos LIPO foram utilizadas lecitinas de soja desengorduradas com diferentes teores de fosfatidilcolina, comercialmente denominadas Lipoid S45 (>45% m/m fosfatidilcolina, 10–18% m/m fosfatidiletanolamina, <4% m/m lisofosfatidilcolina e <3% m/m triacilgliceróis), Lipoid S75 (>75% m/m fosfatidilcolina, 10–18% m/m

fosfatidiletanolamina, <4% m/m lisofosfatidilcolina e <3% w/w triacilgliceróis) e Lipoid S100 (>98% m/m fosfatidilcolina) da Lipoid GmbH (Alemanha).

A produção de lipossomas foi realizada pelo método de injeção de etanol, conforme metodologia proposta por Michelon *et al.* (2016). Para realização desse processo 5 mL de uma dispersão etanólica contendo os fosfolipídios (156 mg/mL) foi injetada em 45 mL de água Milli-Q (1:10 v/v) através de bomba peristáltica a uma vazão de alimentação de 10 mL/min, com agitação mecânica e temperatura mantidas constantes em 500 rpm e 40°C, respectivamente. Após a alimentação completa da dispersão etanólica contendo os fosfolipídios, a dispersão aquosa final contendo os lipossomas formados (15,6mg/mL) foi refrigerada a 8°C para consolidação das estruturas formadas e sua posterior caracterização.

Um procedimento similar foi realizado para a produção dos lipossomas contendo os carotenoides (SCAR), nesse caso foram adicionados 1,56 mg/ml de carotenoides microbianos na dispersão etanólica contendo os fosfolipídios do Lipoid S45 (156mg/mL). Os carotenoides microbianos foram produzidos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7082 através de meios de cultivos de baixo custo utilizando melado de cana-de-açúcar, água de maceração de milho e água proveniente da parboilização de arroz (Otero *et al.*, 2019) e (Dias Rodrigues *et al.*, 2019).

#### *Caracterização dos lipossomas*

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersidade dos lipossomas foram determinados por espalhamento de luz dinâmico, através da técnica de espectroscopia de correlação de fôtons utilizando o laser de alta potência do equipamento *Zetasizer Nano-ZS* (Malvern Instruments, UK). O potencial elétrico dos lipossomas foi avaliado em termos de valores de potencial- $\zeta$ . A determinação do potencial- $\zeta$  dos lipossomas foi realizada utilizando também o equipamento *Zetasizer Nano-ZS* (Malvern Instruments, UK). A mobilidade eletroforética foi obtida através da técnica de *Laser Doppler Velocimetry* (LDV), e as conversões das medidas de mobilidade eletroforética em valores de potencial- $\zeta$  foi realizada utilizando o modelo matemático de Smoluchowski. Na Tabela 1 estão sumarizados a caracterização dos lipossomas utilizados neste estudo.

#### *Animais*

As amostras foram obtidas em canis particulares. A coleta seminal foi realizada semanalmente (2 por cão), de 10 machos clinicamente saldáveis, Australian Cattle Dog, com idade entre 2 e 6 anos, previamente condicionados à coleta e fertilidade comprovada *in vivo*.

Tabela 1. Caracterização diâmetro médio (Dh), índice de polidispersividade (IPd), Potencial- $\zeta$  e pH dos diferentes lipossomas

Lipossomas	Dh (nm)	IPd (%)	Potencial- $\zeta$ (mV)	pH
S45	150,3 ± 19,7	0,302 ± 0,02	-35,3 ± 1,63	4,67
S75	111,3 ± 7,9	0,416 ± 0,05	-39,8 ± 0,28	5,25
S100	281,9 ± 19,0	0,146 ± 0,06	-9,51 ± 1,83	5,36
SCAR	237,2 ± 5,62	0,12 ± 0,06	-55,19 ± 0,38	7,00

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

### *Preparo dos diluentes*

Um dos controles ou diluente base utilizado foi o Tris-glicose (TG), contendo: 3,025g de Tris (hidroximetil)-aminometano; 1,25g de glicose; 1,7g de citrato de sódio monohidratado e água destilada (*q.s.p.* 100mL). O pH foi de 6,84 e osmolaridade de 364mOsm.

Para produção dos meios contendo os lipossomas, os sais componentes do TG, foram adicionados nas dispersões contendo 10mM dos lipossomas, que posteriormente foram submetidas à banho maria por cerca de 15min, até perda de aproximadamente 10% do peso, reconstituído ao final, afim de realizar a evaporação do etanol. Foi adicionado aos meios de TG contendo 10mM dos lipossomas (S45; S75; S100 e S100CAR) o volume de TG necessário para a produção dos tratamentos com concentrações de 10mM; 7,5mM; 5mM; 3,75mM; 2,5mM e 1,25mM.

O PL foi separado usando 40 ml de gema de ovo diluídos em 60 ml do diluente TG. O PL constitui-se do sobrenadante final proveniente de três centrifugações sucessivas à 10.000Xg por 45 min., descartando os *pellets* formados entre os processamentos (Corcini *et al.*, 2016). Para a produção dos tratamentos no diluente PL foi adicionado o volume dos meios TG contendo os lipossomas para chegar as concentrações de 5mM; 3,75mM; 2,5mM e 1,25mM.

### *Coleta e processamento seminal*

A segunda fração seminal (rica em espermatozoides) foi obtida através da manipulação digital (Christiansen, 1986). Apenas amostras com motilidade total (MT) superior à 80% foram inclusas neste estudo, sendo o n=6 para pesquisa com S45 e S75 e n= 10 para S100 e SCAR. A concentração espermática foi determinada através da câmara de Neubauer e o ejaculado foi diluído em TG para obtenção da concentração de 200 milhões de espermatozoides móveis/mL. Uma alíquota de cada amostra foi diluída (1:1 v/v) nos diferentes tratamentos, submetidas a estabilização da temperatura em 20°C, e após à curva de resfriamento (0,5C/min), sendo posteriormente mantidas em refrigeração a 5°C.

### *Avaliação da cinética espermática*

Os parâmetros avaliados foram: motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP); velocidade curvilínea (VCL); velocidade linear progressiva (VSL); velocidade média da trajetória (VAP); distância curvilínea (DCL); distância linear progressiva (DSL); distância média da trajetória (DAP); retilinearidade (STR); linearidade (LIN); frequência de batimento flagelar cruzado (BCF); coeficiente de oscilação (WOB); amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH). As avaliações foram realizadas através do sistema automatizado *Computer Assisted Sperm Analysis* (Sperm Vision® 3.5, Minitub, Tiefenbach, Germany), em microscópio de contraste de fase 200 X (AxioScope A1®, Zeiss, Germany).

As avaliações foram realizadas em 3h, ao fim da curva de resfriamento e estabilização das amostras, e após a manutenção das amostras em refrigeração, por 24h, 48h, 72h e 96h. Uma alíquota de 3 $\mu$ L de cada amostra foi alocada em uma lâmina microscópica e uma lamínula pré-aquecidas a 37°C foi alocada acima da amostra; a avaliação celular consistia em 150 células por campo, sendo avaliados 6 campos aleatórios.

### *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas com o *software Statistix 10* (Analytical Software, 2014). O teste de Shapiro-Wilk foi empregado para verificação da normalidade dos dados. Após a realização do ANOVA, as médias foram comparadas pelo teste do Tukey. A significância foi atribuída a todas as médias com  $p < 0,05$ . As médias individuais com o uso de cada lipossoma, em cada intervalo de avaliação, foram comparadas separadamente para TG e PL. Nas 73h de refrigeração, as médias obtidas para as distintas concentrações de cada lipossoma, foram comparadas com o uso de TG e PL.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Devido ao grande volume de dados obtidos neste estudo, os resultados dos parâmetros de cinética espermática secundários às principais conclusões foram representados sistematicamente da Tabela 4 a 53 nos Dados Complementares do artigo.

### *Tris-glicose versus plasma de gema de ovo*

As médias de MT e MP em D3 com o uso de PL foram estatisticamente superiores ( $p < 0,05$ ) quando comparadas ao uso de TG, independente do LIPO ou concentração testada (Tabela 2 a 53). A eficiência do PL como diluente de criopreservação na espécie canina frente ao uso do diluente Tris-gema já foi relatado na literatura, principalmente devido a presença de grânulos, minerais e compostos como lipoproteína de alta densidade da gema do ovo presente

no Tris-gema, que inibem a respiração celular causando prejuízos à viabilidade espermática (Pace; Graham, 1974).

No diluente no PL o LDL é mantido, e durante o resfriamento ocorre a interação das micelas de LDL com a membrana plasmática dos espermatozoides, a diminuição do influxo de fosfolipídios e colesterol na membrana celular (Bergeron *et al.*, 2004), há a formação de interface entre ácidos graxos do LDL e a água (Anton *et al.*, 2003), além de formar complexos com proteínas do plasma seminal, evitando a ação deletéria destas sobre as membranas (Manjunath *et al.*, 2002). Os melhores resultados de cinética com o uso do PL, quando comparado ao TG podem ser explicados pela ação crioprotetora do LDL.

#### *Uso dos lipossomas em TRIS-glicose versus Plasma de gema de ovo*

As comparações das médias de cinética obtidas em TG e PL com S45, S75, S100 e SCAR na Tabela 2 a 53. Na avaliação de 72h a MT e MP foi superior com a utilização das diferentes concentrações dos lipossomas no diluente PL quando comparado ao TG ( $p < 0,05$ ). Em relação aos demais parâmetros de cinética espermática, as médias foram superiores, com a utilização de PL nos lipossomas S45 e S75 nas diferentes concentrações testadas, quando comparado aos tratamentos com a utilização de TG como diluente base ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, com o uso de 2,5mM de S100 e SCAR, e 1,25mM do SCAR, as médias dos demais parâmetros de cinética, foram superiores com o uso do meio base PL em relação ao TG ( $p < 0,05$ ). A concentração de 5mM causou morte espermática a partir das 72h para S45, e em 96h para os demais lipossomas.

Os resultados indicam que há um efeito aditivo na crioproteção do LDL do PL e os lipossomas, os mecanismos de ação dos lipossomas estudados indicam a incorporação da fosfatidilcolina nos fosfolipídios nas membranas espermáticas, que inclusive, em perus aumentou a com fertilidade *in vivo* através de inseminação artificial (Long; Conn, 2012). Adicionalmente ocorre a interação LIPO com componentes do plasma seminal (Belala *et al.*, 2016), como proteínas que levam a capacitação espermática.

#### *Lipossomas e concentrações em Plasma de gema de ovo*

No diluente PL as concentrações de 5mM e 3,75mM, dos lipossomas estudados, no diluente TG demonstraram-se espermicidas imediatamente após a diluição.

#### *Lipossoma S45*

As avaliações nos diferentes tempos avaliados com o uso do S45 estão detalhadas nas Tabelas 4 a 16 (Dados Complementares). A concentração de 1,25mM do lipossoma S45 no diluente PL demonstrou-se eficiente na manutenção da MT e MP nas avaliações de 3h a 96h ( $p < 0,05$ ), com maiores médias nas 72h para DSL, VSL e LIN comparado aos demais

tratamentos ( $p < 0,05$ ). Os demais parâmetros de cinética do S45 não diferiram do controle ( $p > 0,05$ ). Com o uso de 5 mM; 3,75 e 2,5mM do S45, as médias de MT e MP na análise de 72h, foram inferiores quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ).

#### *Lipossoma S75*

Com o uso de 1,25mM de S75 no diluente PL nas 72h a MP foi superior aos demais tratamentos, como sumarizado na Tabela 2. Os demais resultados obtidos com o uso de S75 estão detalhados na Tabela 17 a 28 (Dados Complementares).

Tabela 2. Motilidade progressiva (MP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações (mM) testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

	5	3,75		2,5		1,25		0		
	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
<b>3h</b>	70,06	77,69	72,05	77,12	71,46	78,42	67,31	81,23	72,46	79,78
	$\pm 1,29^{AB}$	$\pm 1,42^{ab}$	$\pm 0,95^A$	$\pm 0,93^b$	$\pm 1,06^A$	$\pm 0,88^{ab}$	$\pm 0,92^B$	$\pm 0,69^a$	$\pm 1,04^A$	$\pm 1,02^{ab}$
<b>24h</b>	68,01	77,14	74,91	78,97	72,63	79,44	67,91	78,54	77,61	79,06
	$\pm 1,04^C$	$\pm 1,49^a$	$\pm 0,85^{AB}$	$\pm 0,89^a$	$\pm 0,97^B$	$\pm 1,03^a$	$\pm 1,49^C$	$\pm 0,96^a$	$\pm 1,03^A$	$\pm 1,36^a$
<b>48h</b>	40,11	58,34	31,94	70,06	30,02	65,54	36,02	62,47	69,65	62,07
	$\pm 2,64^B$	$\pm 1,74^c$	$\pm 2,24^{BC}$	$\pm 1,17^a$	$\pm 2,55^C$	$\pm 1,64^{ab}$	$\pm 2,57^{BC}$	$\pm 1,56^{bc}$	$\pm 0,32^A$	$\pm 2,18^{bc}$
<b>72h</b>	11,09	45,80	12,62	60,27	15,49	51,77	17,37	59,79	56,55	54,09
	$\pm 1,70^B$	$\pm 1,53^{c*}$	$\pm 2,23^B$	$\pm 1,33^{a*}$	$\pm 2,37^B$	$\pm 1,76^{b*}$	$\pm 2,46^B$	$\pm 1,27^{a*}$	$\pm 1,49^A$	$\pm 2,12^{ab}$
<b>96h</b>	-	24,88	7,04	46,03	9,40	39,43	12,00	55,25	36,23	35,83
		$\pm 1,86^d$	$\pm 1,48^B$	$\pm 1,78^b$	$\pm 1,92^B$	$\pm 1,74^{bc}$	$\pm 2,08^B$	$\pm 1,57^a$	$\pm 2,12^A$	$\pm 1,94^c$

Os resultados estão expressos em médias  $\pm$  D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

A MT e índices de distância, velocidade e ALH superiores ao controle ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente o STR foi menor ( $p < 0,05$ ), e os demais parâmetros de cinética não diferiram do controle ( $p > 0,05$ ). A MT e MP não diferiu do controle até 72h com uso de 2,5mM, e não houve diferenças significativas para os demais parâmetros ( $p > 0,05$ ), exceto VCL, que foi superior ao controle ( $p < 0,05$ ). As médias de MT, MP, parâmetros de distância e velocidade e ALH foram maiores, quando comparado ao controle as 72h, com o uso de 3,75Mol ( $p < 0,05$ ), sem diferença significativa nos demais parâmetros ( $p > 0,05$ ). As menores médias de MT e MP foram observadas com o uso de 5mM na avaliação as 72h ( $p < 0,05$ ).

### *Lipossoma S100*

Da Tabela 29 a 41 (Dados complementares) estão sumarizadas as médias obtidas para S100 nos diferentes tempos de refrigeração. Na avaliação das 96 horas, as quatro concentrações do lipossoma adicionadas ao PL, demonstraram-se eficientes na manutenção da MT. Com o uso de 1,25mM a MP foi superior ao controle e ao tratamento com 5mM ( $p < 0,05$ ), não diferindo de 2,5mM de 3,75mM ( $p > 0,05$ ). O STR, LIN e WOB obtiveram as menores médias com o uso de 1,25mM ( $p < 0,05$ ).

O S100 na concentração 2,5mM no diluente PL foi eficiente na manutenção de todos os parâmetros de cinética espermática, quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ). Os tratamentos 3,75mM o DAP DSL; VAP; VSL foram superiores ao controle ( $p < 0,05$ ), com os demais parâmetros de cinética não diferindo com o mesmo ( $p > 0,05$ ). A concentração 5mM se demonstrou eficiente na manutenção dos parâmetros de cinética espermática, quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Médias dos valores de motilidade progressiva (MP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

	5mM		3,75mM		2,5mM		1,25mM		0mM	
	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	58,27 ±1,64 <sup>A</sup>	73,51 ±1,38 <sup>a</sup>	62,46 ±1,98 <sup>A</sup>	71,95 ±1,37 <sup>ab</sup>	61,97 ±1,91 <sup>A</sup>	66,85 ±1,56 <sup>b</sup>	61,76 ±2,56 <sup>A</sup>	71,83 ±1,33 <sup>ab</sup>	63,19 ±1,15 <sup>A</sup>	74,86 ±1,33 <sup>a</sup>
24h	35,18 ±3,83 <sup>B</sup>	65,92 ±1,23 <sup>a</sup>	40,12 ±3,43 <sup>AB</sup>	65,92 ±1,57 <sup>a</sup>	50,36 ±3,33 <sup>A</sup>	65,11 ±1,66 <sup>a</sup>	46,51 ±3,23 <sup>AB</sup>	64,55 ±2,03 <sup>a</sup>	48,98 ±3,32 <sup>A</sup>	68,99 ±1,03 <sup>a</sup>
48h	10,41 ±1,36 <sup>C</sup>	34,94 ±2,65 <sup>b</sup>	21,14 ±2,64 <sup>B</sup>	48,39 ±2,45 <sup>a</sup>	30,06 ±2,89 <sup>B</sup>	49,51 ±2,94 <sup>a</sup>	41,54 ±3,22 <sup>A</sup>	49,21 ±3,14 <sup>a</sup>	42,23 ±2,73 <sup>A</sup>	46,41 ±2,75 <sup>a</sup>
72h	5,16 ±0,53 <sup>CD</sup>	24,87 ±1,85 <sup>c*</sup>	4,61 ±0,67 <sup>D</sup>	36,76 ±2,29 <sup>b*</sup>	10,92 ±0,96 <sup>C</sup>	40,09 ±2,86 <sup>ab*</sup>	23,45 ±2,22 <sup>B</sup>	48,30 ±1,93 <sup>a*</sup>	34,59 ±1,53 <sup>A</sup>	40,93 ±2,15 <sup>ab*</sup>
96h	- ±1,47 <sup>d</sup>	20,08 ±0,97 <sup>B</sup>	3,39 ±2,74 <sup>c</sup>	27,93 ±1,15 <sup>B</sup>	10,00 ±2,46 <sup>b</sup>	36,25 ±2,62 <sup>A</sup>	28,54 ±1,17 <sup>a</sup>	44,49 ±2,09 <sup>A</sup>	26,47 ±1,03 <sup>bc</sup>	35,25

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra.

Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

### *Lipossoma SCAR*

O uso de 1,25mM do SCAR no diluente PL obteve MP superior que os demais tratamentos na última avaliação, como sumarizado na Tabela 3 ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente, 1,25mM de SCAR em PL foi eficiente na manutenção da MT nas avaliações de 24h a 96h, ( $p$

$< 0,05$ ), o DAP, VAP foram superiores ( $p < 0,05$ ), e os demais parâmetros não diferiram, quando comparados ao controle ( $p > 0,05$ ).

A MT e MP não diferiu do controle a partir de 24h com 2,5mM ( $p > 0,05$ ), e nas 72h os demais parâmetros foram eficientes quando comparados ao controle ( $p < 0,05$ ). No último tempo de avaliação com o uso de 3,75mM a MT, DSL, VSL, STR e WOB foram inferiores, e a MP foi superior, quando comparadas ao controle ( $p < 0,05$ ). O uso de 5mM obteve as menores médias de MT e MP dos tratamentos testados ( $p < 0,05$ ). As demais avaliações nos diferentes tempos com o uso do SCAR estão detalhadas na Tabela 42 a 53.

#### *Cinética espermática dos preparados de LIPO e $\beta$ -caroteno*

Como detalhado na Tabela 2, o diluente PL contendo S75 na concentração de 1,25mM foi o mais eficiente na manutenção da cinética espermática quando comparado aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). Este LIPO é composto no mínimo por 75% de fosfatidilcolina de soja. Graham e Foote (1987) demonstraram que a fosfatidilcolina, juntamente com a fosfatilserina são os fosfolipídios da gema de ovo mais eficientes na crioproteção espermática, propondo que há a reposição dos lipídeos de membrana, diminuindo assim os efeitos de transição de fase com a adição destes fosfolipídios em diluentes.

Houve efeitos benéficos com a adição do  $\beta$ -caroteno encapsulado aos LIPO (SCAR) no diluente de resfriamento PL (Tabela 3), provavelmente por sua ação antioxidante, já demonstrada com outros carotenoides não encapsulados, na criopreservação espermática de cães (Kirti *et al.*, 2014), suínos (Lee; Kim, 2018), galos (Mehdipour *et al.*, 2020; Najafi; *et al.*, 2020), carneiros (Fang *et al.*, 2015) e touros (Farzan; Chamani; Varnaseri, 2014).

O choque térmico e a interação com oxigênio atmosférico, aumenta a produção de ROS, e leva ao desequilíbrio entre radicais livres e dos antioxidantes presentes no sêmen (Medeiros *et al.*, 2002). Devido ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados na membrana e poucas defesas antioxidantes, os espermatozoides são altamente sensíveis ao estresse oxidativo (Jones; Mann; Sherins, 1979; Gavella; Lipovac, 1992; Griveau; Le Lannou, 1997). Altas taxas de ROS, elevam a lipoperoxidação lipídica das membranas, inativam enzimas glicolíticas e levam os espermatozoides à capacitação, em níveis extremos à deterioração espermática (Alvarez; Storey, 1993; Leclerc; De Lamirande; Gagnon, 1997).

## 4 CONCLUSÃO

Os lipossomas S75 e SCAR na concentração de 1,25mM foram os mais eficientes na manutenção da motilidade progressiva, parâmetros de distância, velocidade, retilinearidade, linearidade, coeficiente de oscilação, movimentação da cabeça e flagelar do sêmen canino

refrigerado por 4 dias. Mais estudos e testes *in vivo* devem ser realizados, afim de verificar a efetividade do uso destes lipossomas em meios de criopreservação.

## REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. **Journal of Andrology**, v.14, n. 3, p. 199-209, 1993.
- AMIDI, F. *et al.* The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell Tissue Bank**, v.17, n. 4, p. 745-756, 2016.
- ANTON, M. *et al.* Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 175–183, 2003.
- AXNÉR, E.; LAGERSON, E. Cryopreservation of dog semen in a tris extender with 1% or 2% soya bean lecithin as a replacement of egg yolk. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 2, p. 262-268, 2016.
- BALBINO, T. A. *et al.* Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical engineering journal**, n. 226, p. 423-433, 2013.
- BECCAGLIA, M.; ANASTASI, P.; LUVONI, G. C. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. **Veterinary Research Communications**, v. 33 n. 1, p. 77-80, 2009.
- BELALA, R. *et al.* The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4 degrees C. **Animal Reproduction Science**, n. 168, p. 100-109, 2016.
- BERGERON, A. *et al.* Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 708-717, 2004.
- CHRISTIANSEN, I. J. Reproduction in the Dog and Cat. **São Paulo, SP, Brazil**, São Paulo: Manole Ltda, 1986.
- CORCINI, C. D. *et al.* Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrologia**, v. 48, n. 1, p. 114-115, 2016.
- DALMAZZO, A. *et al.* Effects of soy lecithin extender on dog sperm cryopreservation. **Animal biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 174-182, 2018.
- DE PAZ, P. *et al.* Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 663-671, 2010.
- DE SOUZA CASTELO, T.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n. 3, p. 67-75, 2008.
- DIAS RODRIGUES, T. V. *et al.* Carotenoid production by Rhodotorula mucilaginosa in batch and fed-batch fermentation using agroindustrial byproducts. **Food technology and biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 388-398, 2019.
- EZZATI, M. *et al.* Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. **Cell Tissue Bank**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2020.
- FANG, Y. *et al.* Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. **Small Ruminant Research**, 130, p. 178-182, 2015.
- FARZAN, M.; CHAMANI, M.; VARNASERI, H. The antioxidant effect of astaxanthin on quantitative and qualitative parameters of bull sperm. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 4, n. 4, p. 425-430, 2014.
- GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. **Arch Androl**, v. 28, n. 2, p. 135-141, 1992.

- GRAHAM, J.; FOOTE, R. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42-52, 1987.
- GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, n. 2, p. 61-69, 1997.
- 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**, n. 11, 2021.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 31, n. 5, p. 531-537, 1979.
- KIRTI, K. *et al.* Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. **Advances in Biology**, v. 2014, n. 1, 2014.
- LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 4, p. 643-656, 1997.
- LEE, E.; KIM, D. Effects of Astaxanthin on Miniature Pig Sperm Cryopreservation. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 6784591, 2018.
- LONG, J.; CONN, T. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 C for 24 hours. **Poultry Science**, v. 91, n. 8, p. 1990-1996, 2012.
- MANJUNATH, P. *et al.* Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.
- MARTINELLI, C. *et al.* Antioxidants and Nanotechnology: Promises and Limits of Potentially Disruptive Approaches in the Treatment of Central Nervous System Diseases. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 3, p. e1901589, 2020.
- MEDEIROS, C. M. *et al.* Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327-344, 2002.
- MEHDIPOUR, M. *et al.* Effect of crocin and naringenin supplementation in cryopreservation medium on post-thaw rooster sperm quality and expression of apoptosis associated genes. **PLoS One**, v. 15, n. 10, p. e0241105, 2020.
- MICHELON, M. *et al.* Structural characterization of  $\beta$ -carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. **Food Research International**, v. 79, p. 95-105, 2016.
- NAJAFI, D. *et al.* Effect of astaxanthin nanoparticles in protecting the post-thawing quality of rooster sperm challenged by cadmium administration. **Poultry Science**, v. 99, n. 3, p. 1678-1686, 2020.
- OLDENHOF, H. *et al.* Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 115-122, 2010.
- OTERO, D. M. *et al.* Carotenoid-producing yeasts in the Brazilian biodiversity: Isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 1, p. 117-129, 2019.
- PACE, M.; GRAHAM, E. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of animal science**, v. 39, n. 6, p. 1144-1149, 1974.
- QUINN, P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v. 22, n. 2, p. 128-146, 1985.
- SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J. *et al.* Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. **Reproductive Biology**, v. 17, n. 3, p. 233-238, 2017.

## DADOS COMPLEMENTARES

Tabela 4. Médias de motilidade espermática total (MT) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5	3,75	2,5	1,25	0					
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	79,55±0,8 <sup>AB</sup>	82,16±1,13 <sup>b</sup>	73,84±1,02 <sup>C</sup>	83,61±0,81 <sup>b</sup>	76,43±1,07 <sup>BC</sup>	84,87±0,56 <sup>b</sup>	80,82±0,71 <sup>A</sup>	89,43±0,67 <sup>a</sup>	81,59±0,67 <sup>A</sup>	88,89±0,07 <sup>a</sup>
24h	33,84±2,27 <sup>C</sup>	80,62±0,87 <sup>b</sup>	40,08±2,79 <sup>C</sup>	79,50±1,13 <sup>b</sup>	57,29±2,04 <sup>B</sup>	78,24±0,88 <sup>b</sup>	79,12±1,10 <sup>A</sup>	87,59±0,65 <sup>a</sup>	80,63±0,83 <sup>A</sup>	86,67±0,52 <sup>a</sup>
48h	7,34±0,66 <sup>C</sup>	65,96±1,66 <sup>c</sup>	12,27±1,16 <sup>C</sup>	80,55±1,08 <sup>a</sup>	29,09±2,07 <sup>B</sup>	71,34±1,22 <sup>b</sup>	70,36±1,37 <sup>A</sup>	76,25±1,19 <sup>ab</sup>	74,52±1,31 <sup>A</sup>	75,36±1,17 <sup>b</sup>
72h	-	37,64±2,02 <sup>d</sup>	6,92±0,8 <sup>D</sup>	49,77±1,23 <sup>c*</sup>	15,95±2,21 <sup>C</sup>	59,05±1,16 <sup>b*</sup>	45,04±2,67 <sup>B</sup>	67,53±1,18 <sup>a*</sup>	56,82±1,97 <sup>A</sup>	67,02±1,01 <sup>a*</sup>
96h	-	22,16±1,98 <sup>c</sup>	5,99±1,29 <sup>C</sup>	16,27±1,94 <sup>b</sup>	4,04±0,84 <sup>C</sup>	32,71±1,72 <sup>b</sup>	28,06±2,59 <sup>B</sup>	57,94±1,61 <sup>a</sup>	37,57±2,48 <sup>A</sup>	59,32±1,41 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 5. Médias de motilidade progressiva (MP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5	3,75	2,5	1,25	0					
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	67,27±0,87 <sup>B</sup>	76,41±1,43 <sup>c</sup>	60,79±1,54 <sup>C</sup>	77,48±0,96 <sup>c</sup>	61,87±1,07 <sup>C</sup>	79,38±0,74 <sup>bc</sup>	69,93±0,95 <sup>AB</sup>	85,05±0,81 <sup>a</sup>	73,65±0,84 <sup>A</sup>	82,50±0,87 <sup>ab</sup>
24h	17,93±1,79 <sup>D</sup>	73,64±1,18 <sup>b</sup>	27,38±2,57 <sup>C</sup>	72,37±1,13 <sup>b</sup>	45,31±2,15 <sup>B</sup>	72,48±1,24 <sup>b</sup>	71,57±1,32 <sup>A</sup>	83,23±0,70 <sup>a</sup>	74,19±0,99 <sup>A</sup>	81,25±0,69 <sup>a</sup>
48h	1,71±0,22 <sup>D</sup>	58,32±1,62 <sup>b</sup>	3,56±0,52 <sup>D</sup>	72,29±1,46 <sup>a</sup>	13,07±1,97 <sup>C</sup>	59,69±1,43 <sup>b</sup>	57,32±1,69 <sup>B</sup>	67,47±1,45 <sup>a</sup>	67,09±1,33 <sup>A</sup>	67,12±1,42 <sup>a</sup>
72h	-	24,67±1,86 <sup>d</sup>	1,97±27 <sup>C</sup>	38,83±1,34 <sup>c*</sup>	8,04±1,83 <sup>C</sup>	45,87±1,2 <sup>b*</sup>	27,68±2,67 <sup>B</sup>	57,83±1,27 <sup>a*</sup>	46,07±1,98 <sup>A</sup>	57,32±1,32 <sup>a*</sup>
96h	-	12,22±1,74 <sup>c</sup>	3,35±0,83 <sup>C</sup>	16,27±1,94 <sup>bc</sup>	1,44±0,42 <sup>C</sup>	19,61±1,82 <sup>b</sup>	15,37±1,97 <sup>B</sup>	48,26±1,65 <sup>a</sup>	27,09±2,35 <sup>A</sup>	43,16±1,87 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 6. Médias dos valores de distância média da trajetória (DAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5	3,75	2,5	1,25	0					
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	33,64±0,38 <sup>B</sup>	39,22±0,47 <sup>bc</sup>	35,12±0,65 <sup>B</sup>	36,64±0,52 <sup>b</sup>	34,32±0,60 <sup>B</sup>	39,19±0,38 <sup>bc</sup>	34,41±0,61 <sup>B</sup>	42,63±0,26 <sup>a</sup>	40,01±0,56 <sup>A</sup>	38,02±0,39 <sup>c</sup>
24h	17,33±0,99 <sup>E</sup>	36,93±0,43 <sup>c</sup>	22,90±1,10 <sup>D</sup>	36,37±0,37 <sup>c</sup>	32,01±0,52 <sup>C</sup>	38,81±0,42 <sup>b</sup>	38,73±0,63 <sup>B</sup>	41,87±0,41 <sup>a</sup>	43,54±0,44 <sup>A</sup>	35,63±0,47 <sup>c</sup>
48h	6,39±0,59 <sup>E</sup>	33,04±0,46 <sup>c</sup>	9,29±0,74 <sup>D</sup>	35,67±0,35 <sup>ab</sup>	14,69±0,98 <sup>C</sup>	32,61±0,51 <sup>c</sup>	34,62±0,42 <sup>B</sup>	37,24±0,68 <sup>a</sup>	41,45±0,65 <sup>A</sup>	34,98±0,40 <sup>b</sup>
72h	-	25,13±0,91 <sup>c</sup>	5,61±0,59 <sup>D</sup>	30,29±0,49 <sup>b*</sup>	8,99±0,89 <sup>C</sup>	32,26±0,41 <sup>b*</sup>	21,44±1,32 <sup>B</sup>	36,02±0,53 <sup>a*</sup>	36,50±0,51 <sup>A</sup>	35,64±0,53 <sup>a</sup>
96h	-	16,35±1,24 <sup>c</sup>	6,04±1,05 <sup>C</sup>	21,46±1,39 <sup>b</sup>	3,95±0,58 <sup>C</sup>	23,91±0,97 <sup>b</sup>	15,10±1,18 <sup>B</sup>	35,26±0,55 <sup>a</sup>	26,06±1,52 <sup>A</sup>	32,81±0,72 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-E) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 7. Médias dos valores de distância curvilínea (DCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5	3,75	2,5	1,25	0					
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	58,27±0,69 <sup>B</sup>	58,80±0,86 <sup>ab</sup>	59,87±1,23 <sup>B</sup>	55,80±0,4 <sup>cd</sup>	58,54±1,10 <sup>B</sup>	53,93±0,57 <sup>d</sup>	56,07±1,41 <sup>B</sup>	60,99±0,48 <sup>a</sup>	66,31±1,19 <sup>A</sup>	57,69±0,66 <sup>bc</sup>
24h	30,28±1,82 <sup>E</sup>	56,72±0,76 <sup>c</sup>	41,79±2,09 <sup>D</sup>	53,33±0,85 <sup>bc</sup>	54,56±0,91 <sup>C</sup>	55,98±1,14 <sup>b</sup>	63,73±1,53 <sup>B</sup>	62,87±0,76 <sup>a</sup>	72,81±1,15 <sup>A</sup>	50,69±0,88 <sup>b</sup>
48h	10,19±0,98 <sup>E</sup>	49,75±1,17 <sup>c</sup>	15,75±1,36 <sup>D</sup>	53,79±0,69 <sup>b</sup>	28,42±1,96 <sup>C</sup>	51,36±1,12 <sup>bc</sup>	61,14±0,90 <sup>B</sup>	58,57±1,18 <sup>a</sup>	66,79±1,53 <sup>A</sup>	52,74±0,74 <sup>bc</sup>
72h	-	40,87±1,63 <sup>c</sup>	8,91±0,95 <sup>D</sup>	45,78±1,06 <sup>b*</sup>	15,36±1,59 <sup>C</sup>	49,22±0,81 <sup>b*</sup>	38,40±2,30 <sup>B</sup>	55,08±0,98 <sup>a*</sup>	58,56±1,17 <sup>A*</sup>	54,61±0,95 <sup>a</sup>
96h	-	26,63±2,12 <sup>c</sup>	9,99±1,74 <sup>C</sup>	35,64±2,44 <sup>b</sup>	6,63±1,00 <sup>C</sup>	37,81±1,46 <sup>b</sup>	27,59±2,13 <sup>B</sup>	54,34±1,33 <sup>a</sup>	45,37±2,60 <sup>A</sup>	53,49±1,11 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-E) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 8. Médias dos valores de distância linear progressiva (DSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL								
3h	18,88±0,21 <sup>C</sup>	29,62±0,50 <sup>bc</sup>	19,01±0,37 <sup>C</sup>	31,38±0,54 <sup>a</sup>	18,91±0,36 <sup>C</sup>	30,76±0,38 <sup>ab</sup>	20,80±0,45 <sup>B</sup>	32,27±0,34 <sup>a</sup>	25,60±0,50 <sup>A</sup>	28,30±0,36 <sup>c</sup>
24h	9,69±0,53 <sup>E</sup>	27,24±0,46 <sup>b</sup>	12,88±0,61 <sup>D</sup>	27,19±0,39 <sup>b</sup>	17,91±0,27 <sup>C</sup>	30,10±0,47 <sup>a</sup>	22,24±0,41 <sup>B</sup>	31,36±0,38 <sup>a</sup>	29,90±0,44 <sup>A</sup>	27,76±0,40 <sup>b</sup>
48h	4,58±0,42 <sup>D</sup>	25,30±0,34 <sup>bc</sup>	6,41±0,49 <sup>D</sup>	26,63±0,35 <sup>ab</sup>	9,52±0,63 <sup>C</sup>	24,05±0,44 <sup>c</sup>	20,44±0,34 <sup>B</sup>	27,15±0,58 <sup>a</sup>	27,95±0,53 <sup>A</sup>	25,94±0,31 <sup>ab</sup>
72h	-	18,20±0,64 <sup>c</sup>	3,99±0,41 <sup>D</sup>	23,02±0,34 <sup>b*</sup>	6,02±0,56 <sup>C</sup>	24,05±0,32 <sup>b*</sup>	12,69±0,76 <sup>B</sup>	26,46±0,41 <sup>a*</sup>	23,08±0,42 <sup>A</sup>	26,32±0,36 <sup>a*</sup>
96h	-	11,68±0,87 <sup>d</sup>	4,12±0,75 <sup>C</sup>	15,10±0,95 <sup>c</sup>	2,59±0,37 <sup>C</sup>	16,66±0,71 <sup>c</sup>	9,39±0,71 <sup>B</sup>	26,00±0,39 <sup>a</sup>	17,15±0,98 <sup>A</sup>	23,21±0,50 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-E) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 9. Médias dos valores de velocidade média da trajetória (VAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	74,75±0,86 <sup>B</sup>	87,37±1,05 <sup>b</sup>	76,94±1,43 <sup>B</sup>	88,97±1,08 <sup>b</sup>	76,95±1,45 <sup>B</sup>	87,60±0,81 <sup>b</sup>	76,57±1,47 <sup>B</sup>	96,48±0,55 <sup>a</sup>	89,30±1,32 <sup>A</sup>	86,10±0,91 <sup>b</sup>
24h	38,56±2,12 <sup>E</sup>	82,10±0,93 <sup>c</sup>	49,90±2,43 <sup>D</sup>	80,69±0,81 <sup>c</sup>	69,34±1,18 <sup>C</sup>	85,06±0,98 <sup>b</sup>	85,89±1,57 <sup>B</sup>	93,71±0,84 <sup>a</sup>	97,83±0,98 <sup>A</sup>	79,29±1,05 <sup>bc</sup>
48h	16,49±1,52 <sup>D</sup>	72,31±1,04 <sup>c</sup>	22,38±1,70 <sup>D</sup>	79,69±0,83 <sup>ab</sup>	33,36±2,21 <sup>C</sup>	72,04±1,14 <sup>c</sup>	75,86±0,97 <sup>B</sup>	82,29±1,51 <sup>a</sup>	92,83±1,52 <sup>A</sup>	77,14±0,84 <sup>b</sup>
72h	-	55,20±1,99 <sup>c</sup>	14,10±1,49 <sup>D</sup>	66,14±1,12 <sup>b*</sup>	22,04±2,13 <sup>C</sup>	71,07±0,94 <sup>b*</sup>	47,72±2,97 <sup>B</sup>	79,27±1,18 <sup>a*</sup>	80,72±1,16 <sup>A</sup>	77,84±1,13 <sup>a</sup>
96h	-	36,88±2,71 <sup>c</sup>	14,12±2,36 <sup>C</sup>	47,80±3,03 <sup>b</sup>	10,02±1,45 <sup>C</sup>	52,55±0,01 <sup>b</sup>	34,91±2,60 <sup>B</sup>	77,46±1,24 <sup>a</sup>	58,62±3,30 <sup>A</sup>	71,90±1,61 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-E) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 10. Médias dos valores de velocidade curvilinear (VCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	129,20±1,63 <sup>B</sup>	130,85±1,91 <sup>b</sup>	130,93±2,75 <sup>B</sup>	125,34±1,89 <sup>bc</sup>	130,81±2,60 <sup>B</sup>	121,04±1,29 <sup>c</sup>	124,76±3,30 <sup>B</sup>	138,18±1,20 <sup>a</sup>	147,85±2,81 <sup>A</sup>	130,67±1,61 <sup>b</sup>
24h	66,85±3,91 <sup>E</sup>	125,96±1,68 <sup>d</sup>	90,71±4,56 <sup>D</sup>	118,30±1,88 <sup>bc</sup>	117,95±2,08 <sup>C</sup>	122,75±2,56 <sup>b</sup>	141,49±3,72 <sup>B</sup>	140,69±1,70 <sup>a</sup>	163,35±2,63 <sup>A</sup>	112,86±2,00 <sup>c</sup>
48h	26,13±2,54 <sup>D</sup>	108,97±2,63 <sup>c</sup>	37,62±3,11 <sup>D</sup>	120,17±1,71 <sup>b</sup>	63,73±4,32 <sup>C</sup>	113,25±2,42 <sup>bc</sup>	133,57±2,00 <sup>B</sup>	129,14±2,59 <sup>a</sup>	149,75±3,69 <sup>A</sup>	116,28±1,64 <sup>bc</sup>
72h	-	89,70±3,58 <sup>c</sup>	22,34±2,42 <sup>D</sup>	100,03±2,41 <sup>b*</sup>	37,27±3,77 <sup>C</sup>	108,33±1,84 <sup>b*</sup>	85,04±5,16 <sup>B</sup>	121,09±2,22 <sup>a*</sup>	129,5±2,74 <sup>A*</sup>	119,20±2,03 <sup>a</sup>
96h	-	59,90±4,63 <sup>c</sup>	23,23±3,91 <sup>C</sup>	79,13±5,33 <sup>b</sup>	16,68±2,51 <sup>C</sup>	83,11±3,07 <sup>b</sup>	63,61±4,70 <sup>B</sup>	119,07±2,99 <sup>a</sup>	101,95±5,66 <sup>A</sup>	117,00±2,49 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-E) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 11. Médias dos valores de velocidade linear progressiva (VSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL								
3h	42,10±0,48 <sup>C</sup>	65,97±1,10 <sup>cd</sup>	41,89±0,85 <sup>C</sup>	70,35±1,11 <sup>ab</sup>	42,65±0,87 <sup>C</sup>	68,98±0,79 <sup>bc</sup>	46,45±1,09 <sup>B</sup>	73,05±0,69 <sup>a</sup>	57,42±1,14 <sup>A</sup>	64,02±0,79 <sup>d</sup>
24h	21,87±1,16 <sup>E</sup>	60,52±0,99 <sup>c</sup>	28,20±1,36 <sup>D</sup>	60,32±0,86 <sup>c</sup>	38,91±0,61 <sup>C</sup>	65,97±1,03 <sup>b</sup>	49,52±1,02 <sup>B</sup>	70,14±0,76 <sup>a</sup>	67,24±0,96 <sup>A</sup>	61,72±0,88 <sup>c</sup>
48h	11,80±1,08 <sup>D</sup>	55,31±0,73 <sup>bc</sup>	15,58±1,17 <sup>D</sup>	59,44±0,76 <sup>a</sup>	21,70±1,41 <sup>C</sup>	53,16±0,99 <sup>c</sup>	44,94±0,79 <sup>B</sup>	60,02±1,28 <sup>a</sup>	62,79±1,16 <sup>A</sup>	57,17±0,61 <sup>ab</sup>
72h	-	40,00±1,42 <sup>c</sup>	10,05±1,07 <sup>D</sup>	50,26±0,75 <sup>b*</sup>	14,99±1,38 <sup>C</sup>	53,03±0,71 <sup>b*</sup>	28,37±1,71 <sup>B</sup>	58,30±0,92 <sup>a*</sup>	51,36±0,97 <sup>A</sup>	57,54±0,76 <sup>a*</sup>
96h	-	26,38±1,90 <sup>d</sup>	9,57±1,68 <sup>C</sup>	33,71±2,09 <sup>c</sup>	6,68±0,94 <sup>C</sup>	36,69±1,48 <sup>c</sup>	21,87±1,56 <sup>B</sup>	57,02±0,83 <sup>a</sup>	38,74±2,13 <sup>A</sup>	50,99±1,14 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-E) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS

Tabela 12. Médias dos valores de retilinearidade (STR) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,55±0,003 <sup>C</sup>	0,74±0,007 <sup>b</sup>	0,54±0,007 <sup>C</sup>	0,78±0,005 <sup>a</sup>	0,55±0,06 <sup>C</sup>	0,77±0,004 <sup>a</sup>	0,61±0,01 <sup>B</sup>	0,75±0,004 <sup>b</sup>	0,63±0,007 <sup>A</sup>	0,73±0,004 <sup>b</sup>
24h	0,48±0,02 <sup>C</sup>	0,73±0,007 <sup>b</sup>	0,50±0,02 <sup>C</sup>	0,74±0,007 <sup>b</sup>	0,55±0,004 <sup>B</sup>	0,76±0,007 <sup>a</sup>	0,57±0,006 <sup>B</sup>	0,74±0,004 <sup>b</sup>	0,68±0,007 <sup>A</sup>	0,77±0,004 <sup>a</sup>
48h	0,40±0,04 <sup>D</sup>	0,76±0,006 <sup>a</sup>	0,47±0,03 <sup>CD</sup>	0,74±0,005 <sup>b</sup>	0,51±0,03 <sup>BC</sup>	0,73±0,005 <sup>b</sup>	0,58±0,006 <sup>AB</sup>	0,72±0,006 <sup>b</sup>	0,67±0,006 <sup>A</sup>	0,73±0,004 <sup>b</sup>
72h	-	0,67±0,02 <sup>b</sup>	0,33±0,03 <sup>C</sup>	0,76±0,0054 <sup>a*</sup>	0,43±0,03 <sup>BC</sup>	0,74±0,0040 <sup>a*</sup>	0,48±0,02 <sup>B</sup>	0,73±0,0031 <sup>a*</sup>	0,63±0,0086 <sup>A</sup>	0,73±0,0028 <sup>a*</sup>
96h	-	0,54±0,03 <sup>c</sup>	0,20±0,03 <sup>B</sup>	0,56±0,03 <sup>c</sup>	0,22±0,03 <sup>B</sup>	0,65±0,02 <sup>b</sup>	0,47±0,03 <sup>A</sup>	0,76±0,005 <sup>a</sup>	0,58±0,02 <sup>A</sup>	0,70±0,004 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 13. Médias dos valores de linearidade (LIN) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,32±0,003 <sup>B</sup>	0,50±0,007 <sup>bc</sup>	0,31±0,003 <sup>B</sup>	0,56±0,009 <sup>a</sup>	0,32±0,004 <sup>B</sup>	0,56±0,007 <sup>a</sup>	0,38±0,008 <sup>A</sup>	0,52±0,006 <sup>b</sup>	0,38±0,005 <sup>A</sup>	0,48±0,005 <sup>c</sup>
24h	0,29±0,02 <sup>C</sup>	0,48±0,007 <sup>d</sup>	0,28±0,01 <sup>C</sup>	0,51±0,009 <sup>bc</sup>	0,32±0,002 <sup>B</sup>	0,56±0,02 <sup>a</sup>	0,35±0,009 <sup>B</sup>	0,49±0,004 <sup>cd</sup>	0,41±0,006 <sup>A</sup>	0,55±0,007 <sup>ab</sup>
48h	0,27±0,03 <sup>B</sup>	0,53±0,01 <sup>a</sup>	0,30±0,02 <sup>B</sup>	0,49±0,007 <sup>ab</sup>	0,28±0,02 <sup>B</sup>	0,47±0,007 <sup>bc</sup>	0,33±0,004 <sup>B</sup>	0,46±0,007 <sup>c</sup>	0,43±0,009 <sup>A</sup>	0,49±0,006 <sup>bc</sup>
72h	-	0,43±0,01 <sup>c</sup>	0,22±0,02 <sup>B</sup>	0,52±0,0097 <sup>a*</sup>	0,27±0,02 <sup>B</sup>	0,49±0,0057 <sup>ab*</sup>	0,27±0,01 <sup>B</sup>	0,48±0,0049 <sup>b*</sup>	0,40±0,01 <sup>A</sup>	0,48±0,0038 <sup>b*</sup>
96h	-	0,34±0,02 <sup>c</sup>	0,13±0,02 <sup>B</sup>	0,35±0,02 <sup>c</sup>	0,15±0,02 <sup>B</sup>	0,42±0,01 <sup>b</sup>	0,57±0,02 <sup>A</sup>	0,50±0,01 <sup>a</sup>	0,33±0,02 <sup>A</sup>	0,43±0,005 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 14. Médias dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,57±0,006 <sup>C</sup>	0,66±0,004 <sup>c</sup>	0,58±0,005 <sup>BC</sup>	0,71±0,006 <sup>ab</sup>	0,58±0,004 <sup>BC</sup>	0,72±0,005 <sup>a</sup>	0,62±0,007 <sup>A</sup>	0,69±0,005 <sup>b</sup>	0,60±0,004 <sup>AB</sup>	0,65±0,003 <sup>c</sup>
24h	0,49±0,02 <sup>B</sup>	0,65±0,004 <sup>c</sup>	0,49±0,02 <sup>BA</sup>	0,68±0,007 <sup>ab</sup>	0,58±0,005 <sup>A</sup>	0,71±0,01 <sup>a</sup>	0,62±0,008 <sup>A</sup>	0,66±0,006 <sup>bc</sup>	0,60±0,005 <sup>A</sup>	0,70±0,006 <sup>a</sup>
48h	0,36±0,03 <sup>B</sup>	0,68±0,01 <sup>a</sup>	0,42±0,03 <sup>B</sup>	0,66±0,005 <sup>ab</sup>	0,42±0,02 <sup>B</sup>	0,64±0,006 <sup>bc</sup>	0,59±0,004 <sup>A</sup>	0,63±0,005 <sup>c</sup>	0,64±0,01 <sup>A</sup>	0,66±0,004 <sup>abc</sup>
72h	-	0,58±0,01 <sup>b</sup>	0,34±0,03 <sup>C</sup>	0,67±0,0079 <sup>a*</sup>	0,38±0,03 <sup>BC</sup>	0,65±0,0052 <sup>a*</sup>	0,44±0,02 <sup>B</sup>	0,65±0,0049 <sup>a*</sup>	0,64±0,01 <sup>A</sup>	0,65±0,0031 <sup>a*</sup>
96h	-	0,47±0,03 <sup>b</sup>	0,19±0,03 <sup>B</sup>	0,49±0,03 <sup>b</sup>	0,21±0,03 <sup>B</sup>	0,60±0,02 <sup>a</sup>	0,41±0,03 <sup>A</sup>	0,66±0,009 <sup>a</sup>	0,48±0,02 <sup>A</sup>	0,60±0,004 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 15. Médias dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	3,72±0,06 <sup>A</sup>	3,52±0,04 <sup>a</sup>	3,55±0,06 <sup>AB</sup>	3,27±0,7 <sup>b</sup>	3,65±0,06 <sup>AB</sup>	3,21±0,05 <sup>b</sup>	3,40±0,09 <sup>BA</sup>	3,58±0,05 <sup>a</sup>	3,81±0,08 <sup>A</sup>	3,70±0,04 <sup>a</sup>
24h	2,43±0,12 <sup>C</sup>	3,57±0,04 <sup>a</sup>	2,66±0,13 <sup>C</sup>	3,29±0,07 <sup>b</sup>	3,14±0,07 <sup>B</sup>	2,93±0,11 <sup>c</sup>	3,49±0,11 <sup>B</sup>	3,73±0,04 <sup>a</sup>	4,23±0,06 <sup>a</sup>	3,17±0,07 <sup>bc</sup>
48h	1,64±0,15 <sup>C</sup>	2,88±0,10 <sup>c</sup>	1,99±0,14 <sup>BC</sup>	3,37±0,05 <sup>ab</sup>	2,33±0,14 <sup>B</sup>	3,15±0,07 <sup>b</sup>	3,45±0,59 <sup>A</sup>	3,44±0,06 <sup>a</sup>	3,71±0,12 <sup>A</sup>	3,20±0,05 <sup>ab</sup>
72h	-	2,72±0,1 <sup>bc</sup>	1,53±1,15 <sup>C</sup>	2,64±0,08 <sup>e*</sup>	1,89±0,15 <sup>C</sup>	2,97±0,05 <sup>ab*</sup>	2,49±0,14 <sup>B</sup>	3,15±0,56 <sup>a*</sup>	3,16±0,09 <sup>A</sup>	3,17±0,03 <sup>a</sup>
96h	-	2,19±0,13 <sup>b</sup>	0,94±0,14 <sup>C</sup>	2,51±0,14 <sup>b</sup>	0,99±0,14 <sup>C</sup>	2,58±0,09 <sup>b</sup>	2,21±0,14 <sup>B</sup>	3,02±0,10 <sup>a</sup>	2,91±0,13 <sup>A</sup>	3,20±0,04 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 16. Médias dos valores de frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S45 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	26,19±0,14 <sup>D</sup>	31,07±0,22 <sup>cd</sup>	26,44±0,16 <sup>CD</sup>	31,99±0,24 <sup>b</sup>	26,93±0,19 <sup>C</sup>	33,17±0,22 <sup>a</sup>	28,88±0,22 <sup>B</sup>	31,78±0,25 <sup>bc</sup>	30,56±0,22 <sup>A</sup>	30,40±0,12 <sup>d</sup>
24h	21,46±1,04 <sup>D</sup>	30,05±0,19 <sup>b</sup>	22,28±0,86 <sup>D</sup>	31,34±0,28 <sup>a</sup>	25,77±0,18 <sup>C</sup>	31,99±0,22 <sup>aa</sup>	28,30±0,36 <sup>B</sup>	31,53±0,21 <sup>a</sup>	31,00±0,19 <sup>A</sup>	31,76±0,24 <sup>aa</sup>
48h	15,08±1,46 <sup>C</sup>	29,92±0,24 <sup>b</sup>	18,16±1,41 <sup>BC</sup>	30,73±0,25 <sup>b</sup>	20,59±1,19 <sup>B</sup>	30,31±0,16 <sup>b</sup>	28,50±0,25 <sup>A</sup>	30,13±0,20 <sup>b</sup>	31,82±0,34 <sup>A</sup>	31,65±0,21 <sup>a</sup>
72h	-	27,67±0,80 <sup>b</sup>	13,6±1,51 <sup>C</sup>	32,05±0,20 <sup>a*</sup>	15,30±1,28 <sup>C</sup>	31,2±0,20 <sup>a*</sup>	22,27±1,26 <sup>B</sup>	31,65±0,20 <sup>a*</sup>	31,33±0,34 <sup>A</sup>	32,04±0,21 <sup>a</sup>
96h	-	22,66±1,46 <sup>c</sup>	8,52±1,32 <sup>C</sup>	24,84±1,34 <sup>bc</sup>	8,66±1,31 <sup>C</sup>	27,90±0,81 <sup>b</sup>	20,58±1,38 <sup>B</sup>	31,84±0,27 <sup>a</sup>	26,04±1,10 <sup>A</sup>	32,00±0,28 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 17. Médias dos valores de motilidade total (MT) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	77,48±1,13 <sup>B</sup>	83,11±1,17 <sup>a</sup>	80,49±0,077 <sup>AB</sup>	82,83±0,068 <sup>a</sup>	80,75±0,76 <sup>A</sup>	82,99±0,76 <sup>a</sup>	78,47±0,69 <sup>AB</sup>	85,53±0,58 <sup>a</sup>	80,97±0,76 <sup>A</sup>	85,07±0,85 <sup>a</sup>
24h	76,19±0,81 <sup>C</sup>	82,48±1,22 <sup>a</sup>	81,51±0,68 <sup>A</sup>	84,04±0,73 <sup>a</sup>	80,10±0,83 <sup>AB</sup>	84,42±0,85 <sup>a</sup>	76,87±0,89 <sup>BC</sup>	82,36±0,87 <sup>a</sup>	81,92±0,95 <sup>A</sup>	83,60±1,10 <sup>a</sup>
48h	51,63±2,65 <sup>B</sup>	66,96±1,52 <sup>c</sup>	46,35±2,19 <sup>B</sup>	76,65±0,91 <sup>a</sup>	42,96±2,67 <sup>B</sup>	75,93±1,30 <sup>ab</sup>	46,28±2,72 <sup>B</sup>	71,39±1,27 <sup>abc</sup>	77,38±1,00 <sup>A</sup>	70,94±1,83 <sup>bc</sup>
72h	18,33±2,13 <sup>B</sup>	58,96±1,39 <sup>c*</sup>	20,62±2,70 <sup>B</sup>	70,00±1,05 <sup>a*</sup>	22,94±2,91 <sup>B</sup>	61,97±1,57 <sup>*</sup>	26,78±2,61 <sup>B</sup>	68,68±1,08 <sup>ab*</sup>	67,34±1,16 <sup>A</sup>	63,55±1,95 <sup>bc</sup>
96h	-	39,62±1,98 <sup>c</sup>	11,70±2,11 <sup>B</sup>	59,45±1,58 <sup>a</sup>	12,79±2,36 <sup>B</sup>	52,18±1,72 <sup>b</sup>	16,87±2,50 <sup>B</sup>	65,08±1,29 <sup>a</sup>	48,84±2,34 <sup>A</sup>	48,70±1,94 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 18. Médias dos valores de distância média da trajetória (DAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	39,88±0,64 <sup>AB</sup>	39,55±0,36 <sup>b</sup>	39,85±0,57 <sup>AB</sup>	39,82±0,33 <sup>b</sup>	41,85±0,57 <sup>A</sup>	42,82±0,41 <sup>a</sup>	38,97±0,52 <sup>B</sup>	43,01±0,36 <sup>a</sup>	41,68±0,60 <sup>A</sup>	37,62±0,39 <sup>c</sup>
24h	40,38±0,40 <sup>B</sup>	38,16±0,56 <sup>b</sup>	40,60±0,37 <sup>B</sup>	38,88±0,56 <sup>ab</sup>	40,06±0,61 <sup>B</sup>	40,37±0,47 <sup>a</sup>	40,30±0,77 <sup>B</sup>	39,91±0,43 <sup>ab</sup>	44,00±0,61 <sup>A</sup>	35,58±0,45 <sup>c</sup>
48h	28,27±1,08 <sup>B</sup>	33,20±0,47 <sup>c</sup>	26,44±0,93 <sup>BC</sup>	38,15±0,41 <sup>a</sup>	23,82±1,24 <sup>C</sup>	36,10±0,31 <sup>b</sup>	28,84±1,38 <sup>B</sup>	37,64±0,54 <sup>ab</sup>	40,79±0,50 <sup>A</sup>	32,35±0,56 <sup>c</sup>
72h	13,04±1,14 <sup>B</sup>	34,66±0,46 <sup>*c</sup>	11,51±1,31 <sup>B</sup>	37,61±0,37 <sup>ab*</sup>	13,56±1,36 <sup>B</sup>	36,72±0,69 <sup>b*</sup>	16,24±1,42 <sup>B</sup>	38,72±0,46 <sup>a*</sup>	38,83±0,69 <sup>A*</sup>	33,57±0,56 <sup>c</sup>
96h	-	28,46±1,60 <sup>c</sup>	7,03±1,13 <sup>B</sup>	36,57±0,66 <sup>a</sup>	7,68±1,16 <sup>B</sup>	32,82±0,86 <sup>b</sup>	10,86±1,48 <sup>B</sup>	38,00±0,58 <sup>a</sup>	30,20±1,26 <sup>A</sup>	30,64±0,80 <sup>bc</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 19. Médias dos valores de distância curvilínea (DCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	66,13±1,50 <sup>B</sup>	58,70±0,58 <sup>b</sup>	66,36±1,59 <sup>B</sup>	57,81±0,80 <sup>b</sup>	73,07±1,44 <sup>A</sup>	62,82±0,57 <sup>a</sup>	67,96±1,10 <sup>AB</sup>	64,56±0,73 <sup>a</sup>	66,48±1,05 <sup>B</sup>	56,47±0,70 <sup>b</sup>
24h	67,89±1,11 <sup>A</sup>	57,84±1,20 <sup>a</sup>	68,08±1,16 <sup>A</sup>	55,63±0,94 <sup>ab</sup>	67,21±1,74 <sup>A</sup>	57,89±0,90 <sup>a</sup>	67,37±1,95 <sup>A</sup>	53,37±1,11 <sup>bc</sup>	62,39±1,62 <sup>A</sup>	50,43±1,04 <sup>c</sup>
48h	50,18±1,85 <sup>B</sup>	50,77±1,04 <sup>b</sup>	49,37±1,74 <sup>B</sup>	56,26±0,96 <sup>a</sup>	44,92±2,39 <sup>B</sup>	56,22±0,70 <sup>a</sup>	52,28±2,42 <sup>B</sup>	56,36±1,05 <sup>a</sup>	63,57±1,31 <sup>A</sup>	46,25±0,97 <sup>c</sup>
72h	22,90±2,03 <sup>B</sup>	56,24±1,07 <sup>a*</sup>	20,78±2,35 <sup>B</sup>	56,86±0,95 <sup>a*</sup>	24,52±2,52 <sup>B</sup>	58,67±1,41 <sup>a*</sup>	29,45±2,68 <sup>B</sup>	58,91±0,93 <sup>a*</sup>	64,29±1,10 <sup>A*</sup>	51,61±0,83 <sup>b</sup>
96h	-	45,33±1,60 <sup>c</sup>	12,81±2,09 <sup>B</sup>	58,63±1,17 <sup>a</sup>	13,25±2,02 <sup>B</sup>	52,91±1,63 <sup>b</sup>	19,70±2,67 <sup>B</sup>	58,93±1,23 <sup>a</sup>	51,68±2,31 <sup>A</sup>	48,27±1,45 <sup>bc</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-B) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05</$

Tabela 20. Médias dos valores de distância linear progressiva (DSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	22,73±0,36 <sup>BC</sup>	30,14±0,34 <sup>b</sup>	22,85±0,37 <sup>BC</sup>	30,73±0,33 <sup>b</sup>	23,79±0,36 <sup>B</sup>	33,60±0,48 <sup>a</sup>	27,75±0,24 <sup>C</sup>	33,02±0,28 <sup>a</sup>	26,45±0,50 <sup>A</sup>	28,41±0,43 <sup>c</sup>
24h	22,06±0,30 <sup>B</sup>	28,73±0,42 <sup>b</sup>	22,51±0,30 <sup>B</sup>	29,88±0,49 <sup>ab</sup>	22,74±0,37 <sup>B</sup>	30,80±0,40 <sup>a</sup>	22,95±0,54 <sup>B</sup>	31,41±0,38 <sup>a</sup>	29,38±0,51 <sup>A</sup>	28,47±0,40 <sup>b</sup>
48h	17,33±0,49 <sup>B</sup>	23,55±0,32 <sup>c</sup>	15,45±0,49 <sup>BC</sup>	28,19±0,35 <sup>a</sup>	14,16±0,69 <sup>C</sup>	25,71±0,25 <sup>b</sup>	15,94±0,73 <sup>BC</sup>	27,67±0,43 <sup>a</sup>	27,42±0,39 <sup>A</sup>	24,55±0,44 <sup>bc</sup>
72h	8,44±0,71 <sup>BC</sup>	23,67±0,34 <sup>*</sup>	6,87±0,75 <sup>C</sup>	27,69±0,24 <sup>ab*</sup>	7,97±0,77 <sup>BC</sup>	26,39±0,47 <sup>b*</sup>	9,66±0,76 <sup>B</sup>	27,78±0,26 <sup>a*</sup>	23,06±0,52 <sup>A</sup>	24,50±0,41 <sup>c*</sup>
96h	-	19,36±0,58 <sup>c</sup>	4,47±0,69 <sup>B</sup>	25,42±0,46 <sup>a</sup>	4,88±0,71 <sup>B</sup>	23,34±0,59 <sup>b</sup>	6,03±0,81 <sup>B</sup>	25,58±0,31 <sup>a</sup>	18,78±0,76 <sup>A</sup>	22,10±0,51 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 21. Médias dos valores de velocidade média da trajetória (VAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	88,61±1,54 <sup>AB</sup>	88,95±0,77 <sup>b</sup>	88,81±1,41 <sup>AB</sup>	88,97±0,69 <sup>b</sup>	93,68±1,30 <sup>A</sup>	95,66±0,82 <sup>a</sup>	86,63±1,14 <sup>B</sup>	95,99±0,77 <sup>a</sup>	93,13±1,21 <sup>A</sup>	84,28±0,85 <sup>c</sup>
24h	88,75±1,00 <sup>B</sup>	84,82±1,21 <sup>b</sup>	89,61±0,98 <sup>B</sup>	86,77±1,18 <sup>ab</sup>	87,79±1,45 <sup>B</sup>	90,10±1,02 <sup>a</sup>	88,59±1,74 <sup>B</sup>	88,03±0,99 <sup>ab</sup>	96,55±1,31 <sup>A</sup>	78,34±0,95 <sup>c</sup>
48h	62,38±2,32 <sup>B</sup>	72,71±1,04 <sup>d</sup>	58,35±1,86 <sup>BC</sup>	84,11±0,86 <sup>a</sup>	52,94±2,65 <sup>C</sup>	81,45±0,69 <sup>a</sup>	63,01±3,01 <sup>B</sup>	84,00±1,23 <sup>a</sup>	90,37±1,24 <sup>A</sup>	71,05±1,28 <sup>b</sup>
72h	29,29±2,49 <sup>BC</sup>	75,90±0,97 <sup>*</sup>	25,79±2,88 <sup>C</sup>	83,04±0,92 <sup>ab*</sup>	31,07±3,05 <sup>BC</sup>	80,45±1,36 <sup>b*</sup>	36,56±3,03 <sup>B</sup>	85,45±0,93 <sup>a*</sup>	84,99±1,54 <sup>A*</sup>	73,57±1,21 <sup>c</sup>
96h	-	61,96±1,87 <sup>c</sup>	16,22±2,56 <sup>B</sup>	81,59±1,42 <sup>a</sup>	17,45±2,59 <sup>B</sup>	72,87±1,91 <sup>b</sup>	23,72±3,19 <sup>B</sup>	83,56±1,34 <sup>a</sup>	66,99±2,74 <sup>A</sup>	66,34±1,71 <sup>bc</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 22. Médias dos valores de velocidade curvilinear (VCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	146,77±3,48 <sup>B</sup>	132,02±1,34 <sup>b</sup>	147,97±3,79 <sup>B</sup>	129,23±1,82 <sup>b</sup>	163,41±3,28 <sup>A</sup>	140,23±1,22 <sup>a</sup>	150,86±2,45 <sup>B</sup>	143,95±1,59 <sup>a</sup>	148,61±2,40 <sup>B</sup>	126,54±1,58 <sup>b</sup>
24h	149,05±2,64 <sup>A</sup>	128,40±2,63 <sup>a</sup>	150,31±2,85 <sup>A</sup>	124,08±2,01 <sup>ab</sup>	147,37±4,04 <sup>A</sup>	129,16±2,00 <sup>a</sup>	148,24±4,41 <sup>A</sup>	11,92±2,52 <sup>bc</sup>	37,22±3,70 <sup>A</sup>	111,12±2,28 <sup>c</sup>
48h	110,10±3,94 <sup>B</sup>	11,15±2,30 <sup>b</sup>	108,23±3,49 <sup>B</sup>	124,07±2,12 <sup>a</sup>	99,20±5,11 <sup>B</sup>	126,82±1,60 <sup>a</sup>	113,97±5,27 <sup>B</sup>	125,77±2,41 <sup>a</sup>	140,82±3,08 <sup>A</sup>	101,65±2,25 <sup>c</sup>
72h	51,29±4,46 <sup>B</sup>	122,91±2,28 <sup>a*</sup>	46,77±5,19 <sup>B</sup>	125,61±2,33 <sup>a*</sup>	55,89±5,61 <sup>B</sup>	128,32±2,85 <sup>a*</sup>	65,78±5,70 <sup>B</sup>	129,97±1,97 <sup>a*</sup>	140,37±2,46 <sup>A*</sup>	112,96±1,87 <sup>b</sup>
96h	-	98,43±3,36 <sup>c</sup>	29,22±4,71 <sup>B</sup>	130,60±2,58 <sup>a</sup>	30,07±4,53 <sup>B</sup>	117,40±3,70 <sup>b</sup>	42,88±5,75 <sup>B</sup>	129,63±2,84 <sup>a</sup>	114,52±5,04 <sup>A</sup>	104,44±3,09 <sup>c</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-B) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 23. Médias dos valores de velocidade linear progressiva (VSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	50,60±0,83 <sup>BC</sup>	67,72±0,70 <sup>b</sup>	51,13±0,92 <sup>BC</sup>	68,62±0,66 <sup>b</sup>	53,43±0,86 <sup>B</sup>	75,02±1,00 <sup>a</sup>	48,53±0,53 <sup>C</sup>	73,68±0,58 <sup>a</sup>	59,46±1,15 <sup>A</sup>	63,56±0,89 <sup>c</sup>
24h	48,66±0,74 <sup>B</sup>	63,79±0,89 <sup>bc</sup>	49,95±0,74 <sup>B</sup>	66,67±1,06 <sup>ab</sup>	50,04±0,89 <sup>B</sup>	68,72±0,85 <sup>a</sup>	50,70±1,21 <sup>B</sup>	69,30±0,80 <sup>a</sup>	64,84±1,16 <sup>A</sup>	62,57±0,83 <sup>c</sup>
48h	38,47±1,49 <sup>B</sup>	51,61±0,69 <sup>c</sup>	34,30±0,99 <sup>BC</sup>	62,17±0,70 <sup>a</sup>	31,79±1,48 <sup>C</sup>	58,04±0,50 <sup>b</sup>	35,04±1,62 <sup>BC</sup>	61,77±0,92 <sup>a</sup>	61,04±0,89 <sup>A</sup>	53,87±0,97 <sup>c</sup>
72h	18,93±1,57 <sup>BC</sup>	51,94±0,71 <sup>a*</sup>	15,61±1,68 <sup>C</sup>	59,84±0,58 <sup>ab*</sup>	18,41±1,74 <sup>B</sup>	57,91±0,91 <sup>b*</sup>	22,08±1,65 <sup>B</sup>	61,44±0,50 <sup>a*</sup>	50,96±1,22 <sup>A</sup>	53,73±0,89 <sup>c</sup>
96h	-	42,29±1,22 <sup>c</sup>	10,40±1,60 <sup>B</sup>	56,88±0,99 <sup>a</sup>	11,18±1,60 <sup>B</sup>	51,95±1,30 <sup>b</sup>	13,27±1,75 <sup>B</sup>	56,47±0,76 <sup>a</sup>	41,90±1,65 <sup>A</sup>	47,90±1,07 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras

Tabela 24. Médias dos valores de retilinearidade (STR) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,57±0,003 <sup>B</sup>	0,75±0,004 <sup>b</sup>	0,57±0,006 <sup>B</sup>	0,76±0,005 <sup>ab</sup>	0,55±0,004 <sup>B</sup>	0,053±0,006 <sup>a</sup>	0,55±0,003 <sup>B</sup>	0,76±0,003 <sup>ab</sup>	0,64±0,01 <sup>A</sup>	0,74±0,003 <sup>b</sup>
24h	0,54±0,006 <sup>B</sup>	0,74±0,004 <sup>c</sup>	0,55±0,005 <sup>B</sup>	0,76±0,005 <sup>bc</sup>	0,57±0,008 <sup>B</sup>	0,75±0,005 <sup>c</sup>	0,56±0,009 <sup>B</sup>	0,78±0,006 <sup>ab</sup>	0,68±0,01 <sup>A</sup>	0,79±0,006 <sup>a</sup>
48h	0,59±0,02 <sup>B</sup>	0,71±0,006 <sup>bc</sup>	0,58±0,009 <sup>B</sup>	0,73±0,005 <sup>a</sup>	0,52±0,02 <sup>C</sup>	0,70±0,004 <sup>c</sup>	0,49±0,02 <sup>C</sup>	0,73±0,006 <sup>ab</sup>	0,67±0,008 <sup>A</sup>	0,75±0,006 <sup>a</sup>
72h	0,43±0,03 <sup>BC</sup>	0,68±0,0057 <sup>b*</sup>	0,32±0,03 <sup>D</sup>	0,72±0,0043 <sup>a*</sup>	0,34±0,03 <sup>CD</sup>	0,72±0,0041 <sup>a*</sup>	0,46±0,03 <sup>B</sup>	0,72±0,0049 <sup>a*</sup>	0,59±0,0097 <sup>A</sup>	0,73±0,0038 <sup>a*</sup>
96h	-	0,66±0,02 <sup>b</sup>	0,21±0,03 <sup>B</sup>	0,69±0,004 <sup>ab</sup>	0,24±0,03 <sup>B</sup>	0,70±0,01 <sup>ab</sup>	0,21±0,03 <sup>B</sup>	0,67±0,003 <sup>b</sup>	0,58±0,02 <sup>A</sup>	0,72±0,006 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 25. Médias dos valores de linearidade (LIN) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,34±0,005 <sup>B</sup>	0,51±0,004 <sup>bc</sup>	0,35±0,006 <sup>B</sup>	0,54±0,01 <sup>a</sup>	0,32±0,002 <sup>BC</sup>	0,53±0,006 <sup>ab</sup>	0,32±0,003 <sup>C</sup>	0,76±0,003 <sup>bc</sup>	0,41±0,12 <sup>A</sup>	0,49±0,006 <sup>c</sup>
24h	0,32±0,004 <sup>B</sup>	0,50±0,007 <sup>c</sup>	0,33±0,004 <sup>B</sup>	0,53±0,008 <sup>bc</sup>	0,36±0,01 <sup>B</sup>	0,53±0,007 <sup>bc</sup>	0,36±0,01 <sup>B</sup>	0,61±0,01 <sup>a</sup>	0,50±0,02 <sup>A</sup>	0,57±0,01 <sup>ab</sup>
48h	0,34±0,01 <sup>B</sup>	0,47±0,009 <sup>bc</sup>	0,32±0,008 <sup>BC</sup>	0,51±0,01 <sup>ab</sup>	0,29±0,02 <sup>CD</sup>	0,45±0,005 <sup>c</sup>	0,27±0,01 <sup>D</sup>	0,49±0,01 <sup>ab</sup>	0,45±0,01 <sup>A</sup>	0,54±0,01 <sup>a</sup>
72h	0,26±0,02 <sup>BC</sup>	0,43±0,0067 <sup>c*</sup>	0,18±0,01 <sup>D</sup>	0,48±0,0069 <sup>a*</sup>	0,20±0,01 <sup>CD</sup>	0,46±0,0062 <sup>b*</sup>	0,29±0,03 <sup>B</sup>	0,48±0,0069 <sup>ab*</sup>	0,36±0,0079 <sup>A</sup>	0,47±0,0046 <sup>ab*</sup>
96h	-	0,43±0,01 <sup>b</sup>	0,13±0,02 <sup>B</sup>	0,43±0,004 <sup>ab</sup>	0,15±0,02 <sup>B</sup>	0,44±0,01 <sup>ab</sup>	0,12±0,02 <sup>B</sup>	0,44±0,008 <sup>ab</sup>	0,35±0,01 <sup>A</sup>	0,47±0,01 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 26. Médias dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,61±0,005 <sup>A</sup>	0,67±0,003 <sup>b</sup>	0,61±0,007 <sup>A</sup>	0,69±0,008 <sup>a</sup>	0,57±0,006 <sup>B</sup>	0,67±0,004 <sup>ab</sup>	0,57±0,003 <sup>B</sup>	0,66±0,003 <sup>b</sup>	0,63±0,009 <sup>A</sup>	0,66±0,003 <sup>b</sup>
24h	0,60±0,005 <sup>B</sup>	0,66±0,006 <sup>c</sup>	0,60±0,006 <sup>B</sup>	0,70±0,006 <sup>b</sup>	0,62±0,01 <sup>B</sup>	0,69±0,005 <sup>b</sup>	0,62±0,01 <sup>B</sup>	0,76±0,01 <sup>a</sup>	0,73±0,01 <sup>A</sup>	0,71±0,01 <sup>b</sup>
48h	0,54±0,02 <sup>B</sup>	0,66±0,007 <sup>bc</sup>	0,54±0,01 <sup>B</sup>	0,68±0,008 <sup>ab</sup>	0,47±0,02 <sup>C</sup>	0,64±0,003 <sup>c</sup>	0,47±0,02 <sup>C</sup>	0,67±0,007 <sup>b</sup>	0,66±0,01 <sup>A</sup>	0,70±0,007 <sup>a</sup>
72h	0,39±0,03 <sup>BC</sup>	0,62±0,0056 <sup>c*</sup>	0,29±0,03 <sup>C</sup>	0,67±0,0067 <sup>a*</sup>	0,32±0,03 <sup>C</sup>	0,64±0,0059 <sup>bc*</sup>	0,42±0,03 <sup>B</sup>	0,66±0,0052 <sup>a*</sup>	0,60±0,0057 <sup>A</sup>	0,65±0,0034 <sup>ab*</sup>
96h	-	0,61±0,02 <sup>b</sup>	0,19±0,03 <sup>B</sup>	0,62±0,003 <sup>ab</sup>	0,22±0,03 <sup>B</sup>	0,61±0,01 <sup>b</sup>	0,21±0,03 <sup>B</sup>	0,65±0,0060 <sup>a</sup>	0,55±0,02 <sup>A</sup>	0,64±0,009 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 27. Médias dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	3,73±0,09 <sup>B</sup>	3,58±0,04 <sup>ab</sup>	3,79±0,11 <sup>B</sup>	3,41±0,08 <sup>b</sup>	4,22±0,08 <sup>A</sup>	3,67±0,03 <sup>a</sup>	3,87±0,06 <sup>B</sup>	3,72±0,04 <sup>a</sup>	3,64±0,09 <sup>B</sup>	3,54±0,04 <sup>ab</sup>
24h	3,77±0,08 <sup>A</sup>	3,57±0,06 <sup>a</sup>	3,74±0,09 <sup>A</sup>	3,44±0,05 <sup>ab</sup>	3,54±0,12 <sup>A</sup>	3,49±0,05 <sup>a</sup>	3,50±0,13 <sup>A</sup>	2,86±0,10 <sup>c</sup>	2,96±0,13 <sup>B</sup>	3,14±0,10 <sup>bc</sup>
48h	3,11±0,09 <sup>AB</sup>	3,01±0,07 <sup>cb</sup>	3,03±0,06 <sup>AB</sup>	3,22±0,08 <sup>bc</sup>	2,93±0,12 <sup>B</sup>	3,61±0,05 <sup>a</sup>	2,95±0,13 <sup>B</sup>	3,37±0,07 <sup>ab</sup>	3,37±0,10 <sup>A</sup>	2,84±0,08 <sup>d</sup>
72h	1,84±0,14 <sup>BC</sup>	3,28±0,05 <sup>a*</sup>	1,68±0,18 <sup>C</sup>	3,19±0,07 <sup>a*</sup>	1,88±0,16 <sup>BC</sup>	3,31±0,06 <sup>a*</sup>	2,25±0,14 <sup>B</sup>	3,35±0,05 <sup>a*</sup>	3,43±0,05 <sup>A</sup>	3,16±0,04 <sup>a</sup>
96h	-	2,79±0,09 <sup>c</sup>	1,09±0,16 <sup>B</sup>	3,55±0,04 <sup>a</sup>	1,09±0,14 <sup>B</sup>	3,08±0,09 <sup>bc</sup>	1,14±0,15 <sup>B</sup>	3,23±0,08 <sup>b</sup>	3,15±0,12 <sup>A</sup>	2,77±0,08 <sup>c</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração

Tabela 28. Médias dos valores de frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S75 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	26,61±0,28 <sup>B</sup>	30,94±0,15 <sup>b</sup>	27,64±0,29 <sup>B</sup>	31,70±0,23 <sup>a</sup>	26,89±0,21 <sup>B</sup>	31,05±0,16 <sup>ab</sup>	23,13±0,24 <sup>B</sup>	31,66±0,16 <sup>a</sup>	31,87±0,33 <sup>A</sup>	30,83±0,19 <sup>b</sup>
24h	26,24±0,28 <sup>D</sup>	31,38±0,26 <sup>c</sup>	27,66±0,24 <sup>CD</sup>	31,34±0,20 <sup>bc</sup>	27,33±0,34 <sup>C</sup>	32,24±0,20 <sup>b</sup>	29,05±0,47 <sup>B</sup>	33,36±0,16 <sup>a</sup>	34,65±0,44 <sup>A</sup>	31,35±0,17 <sup>c</sup>
48h	26,33±0,74 <sup>B</sup>	31,28±0,24 <sup>b</sup>	26,08±0,45 <sup>B</sup>	32,67±0,18 <sup>a</sup>	22,70±1,00 <sup>C</sup>	30,89±0,16 <sup>b</sup>	23,60±1,00 <sup>BC</sup>	32,36±0,19 <sup>a</sup>	33,08±0,27 <sup>A</sup>	31,17±0,25 <sup>d</sup>
72h	17,29±1,35 <sup>B</sup>	31,02±0,25 <sup>d*</sup>	15,09±1,61 <sup>B</sup>	33,24±0,28 <sup>a*</sup>	16,28±1,49 <sup>B</sup>	31,51±0,27 <sup>cd*</sup>	18,91±1,25 <sup>B</sup>	32,83±0,21 <sup>ab*</sup>	30,95±0,33 <sup>A</sup>	32,13±0,22 <sup>bc*</sup>
96h	-	30,93±0,83 <sup>b</sup>	9,59±1,38 <sup>B</sup>	32,69±0,30 <sup>ab</sup>	9,75±1,28 <sup>B</sup>	31,36±0,62 <sup>b</sup>	9,56±1,27 <sup>B</sup>	33,82±0,30 <sup>a</sup>	29,12±0,96 <sup>A</sup>	32,59±0,44 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=6). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 29. Médias dos valores de motilidade total (MT) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	72,18±1,46 <sup>A</sup>	80,56±1,07 <sup>b</sup>	72,24±2,21 <sup>A</sup>	85,29±0,72 <sup>a</sup>	62,40±1,81 <sup>BC</sup>	84,46±1,25 <sup>ab</sup>	57,79±2,13 <sup>C</sup>	81,26±1,02 <sup>ab</sup>	67,63±1,76 <sup>AB</sup>	83,78±0,97 <sup>ab</sup>
24h	51,39±2,40 <sup>AB</sup>	82,25±0,94 <sup>a</sup>	56,11±2,07 <sup>A</sup>	79,72±0,83 <sup>a</sup>	44,16±2,97 <sup>B</sup>	78,99±1,18 <sup>a</sup>	43,23±2,67 <sup>B</sup>	70,61±1,19 <sup>a</sup>	57,59±2,06 <sup>A</sup>	79,57±1,09 <sup>a</sup>
48h	24,58±2,28 <sup>B</sup>	66,57±2,42 <sup>ab</sup>	14,52±1,57 <sup>C</sup>	58,77±2,19 <sup>b</sup>	11,97±1,51 <sup>C</sup>	60,09±2,16 <sup>b</sup>	25,49±2,03 <sup>B</sup>	69,38±1,99 <sup>a</sup>	43,42±1,74 <sup>A</sup>	60,89±2,29 <sup>ab</sup>
72h	12,68±1,32 <sup>B</sup>	39,40±2,02 <sup>c*</sup>	-	55,39±1,70 <sup>ab</sup>	22,03±0,96 <sup>AB</sup>	55,57±95 <sup>ab*</sup>	15,35±1,57 <sup>B</sup>	58,97±1,92 <sup>a</sup>	24,81±1,95 <sup>A</sup>	47,43±2,67 <sup>bc</sup>
96h	-	42,57±2,88 <sup>a</sup>	-	48,13±2,36 <sup>a</sup>	-	45,42±1,76 <sup>a</sup>	11,01±1,74 <sup>B</sup>	50,01±4,01 <sup>a</sup>	23,48±2,59 <sup>A</sup>	46,19±2,19 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 30. Médias dos valores de motilidade progressiva (MP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	61,58±1,97 <sup>A</sup>	72,79±1,53 <sup>a</sup>	63,35±2,61 <sup>A</sup>	77,74±1,37 <sup>a</sup>	50,13±2,21 <sup>B</sup>	77,01±1,68 <sup>a</sup>	48,01±2,46 <sup>B</sup>	74,20±1,14 <sup>a</sup>	50,52±2,19 <sup>B</sup>	74,63±0,97 <sup>a</sup>
24h	37,09±2,59 <sup>AB</sup>	72,87±1,67 <sup>a</sup>	38,59±2,52 <sup>A</sup>	72,86±1,00 <sup>a</sup>	28,20±2,43 <sup>B</sup>	70,13±1,62 <sup>a</sup>	29,96±2,67 <sup>AB</sup>	70,31±1,67 <sup>a</sup>	36,69±2,37 <sup>AB</sup>	68,63±1,61 <sup>a</sup>
48h	7,40±0,97 <sup>B</sup>	49,51±2,92 <sup>ab</sup>	2,81±0,40 <sup>C</sup>	42,60±2,71 <sup>b</sup>	1,99±0,29 <sup>C</sup>	46,22±2,53 <sup>ab</sup>	8,46±0,96 <sup>B</sup>	54,30±2,29 <sup>a</sup>	26,93±1,96 <sup>A</sup>	41,19±2,58 <sup>b</sup>
72h	2,07±0,28 <sup>B</sup>	22,42±1,96 <sup>c*</sup>	-	38,96±1,84 <sup>ab</sup>	2,19±0,50 <sup>B</sup>	42,23±3,09 <sup>a*</sup>	5,91±1,03 <sup>B</sup>	43,29±1,89 <sup>a</sup>	11,28±1,29 <sup>A</sup>	31,14±2,26 <sup>b</sup>
96h	-	25,91±2,65 <sup>b</sup>	-	32,27±2,31 <sup>ab</sup>	-	30,18±1,37 <sup>ab</sup>	5,73±1,74 <sup>B</sup>	35,69±3,05 <sup>a</sup>	10,97±1,42 <sup>A</sup>	25,26±2,03 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 31. Médias dos valores de distância média da trajetória (DAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	41,21±0,84 <sup>A</sup>	38,85±0,74 <sup>bc</sup>	39,21±0,84 <sup>AB</sup>	42,92±0,91 <sup>a</sup>	38,24±0,74 <sup>AB</sup>	41,19±0,83 <sup>ab</sup>	37,27±1,03 <sup>B</sup>	39,60±0,88 <sup>bc</sup>	31,94±0,84 <sup>C</sup>	36,71±0,66 <sup>c</sup>
24h	31,31±1,43 <sup>A</sup>	38,50±0,97 <sup>a</sup>	32,33±1,15 <sup>A</sup>	38,59±0,80 <sup>a</sup>	25,91±1,28 <sup>B</sup>	38,13±0,78 <sup>a</sup>	23,25±1,65 <sup>B</sup>	38,55±0,76 <sup>a</sup>	27,69±0,88 <sup>AB</sup>	33,46±0,71 <sup>b</sup>
48h	12,52±0,08 <sup>BC</sup>	32,65±0,91 <sup>ab</sup>	7,43±0,88 <sup>D</sup>	34,27±1,13 <sup>ab</sup>	9,03±1,21 <sup>CD</sup>	32,50±0,80 <sup>ab</sup>	13,42±1,00 <sup>B</sup>	35,35±0,94 <sup>a</sup>	27,55±1,32 <sup>A</sup>	30,57±0,89 <sup>b</sup>
72h	10,77±0,85 <sup>B</sup>	26,97±0,96 <sup>b*</sup>	-	33,54±0,69 <sup>a</sup>	12,52±2,05 <sup>B</sup>	33,67±1,28 <sup>a*</sup>	13,72±1,50 <sup>B</sup>	37,04±0,92 <sup>a</sup>	25,12±1,55 <sup>A</sup>	27,37±1,08 <sup>b</sup>
96h	-	25,95±1,61 <sup>b</sup>	-	33,81±0,82 <sup>a</sup>	-	30,75±0,62 <sup>ab</sup>	9,53±1,40 <sup>B</sup>	27,78±2,14 <sup>b</sup>	24,78±2,46 <sup>A</sup>	27,63±1,34 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 32. Médias dos valores de distância curvilinear (DCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	73,70±1,57 <sup>A</sup>	59,09±0,92 <sup>c</sup>	69,99±1,84 <sup>AB</sup>	74,14±2,13 <sup>a</sup>	69,81±1,59 <sup>AB</sup>	68,70±1,57 <sup>ab</sup>	66,33±1,99 <sup>B</sup>	66,51±1,80 <sup>b</sup>	56,64±1,28 <sup>C</sup>	60,01±1,34 <sup>c</sup>
24h	56,33±2,83 <sup>AB</sup>	65,95±1,78 <sup>a</sup>	59,05±1,98 <sup>A</sup>	61,38±1,98 <sup>a</sup>	47,87±2,28 <sup>BC</sup>	64,66±1,56 <sup>a</sup>	42,94±3,31 <sup>C</sup>	65,39±1,40 <sup>a</sup>	53,69±1,72 <sup>AB</sup>	53,42±1,19 <sup>b</sup>
48h	21,65±1,90 <sup>DC</sup>	56,23±1,74 <sup>abc</sup>	13,17±1,61 <sup>D</sup>	58,97±2,15 <sup>ab</sup>	16,16±2,19 <sup>CD</sup>	51,46±1,56 <sup>c</sup>	26,17±2,04 <sup>B</sup>	59,48±1,80 <sup>a</sup>	48,53±2,29 <sup>A</sup>	51,79±1,76 <sup>bc</sup>
72h	18,13±1,53 <sup>B</sup>	45,89±1,49 <sup>b*</sup>	-	58,06±1,29 <sup>a</sup>	21,35±3,69 <sup>B</sup>	57,021±2,69 <sup>a*</sup>	21,13±2,39 <sup>B</sup>	62,48±1,93 <sup>a</sup>	44,66±2,89 <sup>A</sup>	45,32±2,17 <sup>b</sup>
96h	-	43,42±2,65 <sup>b</sup>	-	54,95±1,19 <sup>a</sup>	-	47,38±1,27 <sup>ab</sup>	13,01±1,76 <sup>B</sup>	46,48±3,57 <sup>ab</sup>	43,58±4,28 <sup>A</sup>	46,63±2,32 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 33. Médias dos valores de distância linear progressiva (DSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	26,28±0,53 <sup>A</sup>	26,62±0,61 <sup>b</sup>	25,22±0,65 <sup>A</sup>	30,33±0,75 <sup>a</sup>	24,24±0,47 <sup>A</sup>	29,89±0,74 <sup>a</sup>	21,60±0,59 <sup>B</sup>	28,83±0,76 <sup>b</sup>	19,86±0,95 <sup>B</sup>	26,82±0,57 <sup>b</sup>
24h	18,79±0,88 <sup>A</sup>	27,04±0,90 <sup>ab</sup>	18,96±0,73 <sup>A</sup>	27,89±0,67 <sup>a</sup>	14,44±0,72 <sup>B</sup>	27,17±0,71 <sup>ab</sup>	13,07±0,87 <sup>B</sup>	27,96±0,74 <sup>a</sup>	15,64±0,65 <sup>B</sup>	24,60±0,70 <sup>b</sup>
48h	7,36±0,61 <sup>BC</sup>	21,80±0,55 <sup>b</sup>	4,54±0,54 <sup>D</sup>	22,82±0,73 <sup>ab</sup>	5,28±0,73 <sup>CD</sup>	21,35±0,37 <sup>b</sup>	7,96±0,57 <sup>B</sup>	24,86±0,76 <sup>a</sup>	15,76±0,72 <sup>A</sup>	21,18±0,83 <sup>b</sup>
72h	6,14±0,34 <sup>B</sup>	17,73±0,74 <sup>*a</sup>	-	22,35±0,52 <sup>b</sup>	7,09±1,17 <sup>B</sup>	22,91±0,86 <sup>ab*</sup>	8,35±0,91 <sup>B</sup>	24,99±0,59 <sup>a</sup>	13,56±0,79 <sup>A</sup>	18,52±0,75 <sup>c</sup>
96h	-	17,18±1,11 <sup>c</sup>	-	23,07±0,69 <sup>a</sup>	-	21,24±0,48 <sup>ab</sup>	6,79±1,01 <sup>B</sup>	18,42±1,44 <sup>bc</sup>	15,01±1,50 <sup>A</sup>	19,05±1,02 <sup>bc</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 34. Médias dos valores de velocidade média da trajetória (VAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	91,91±1,70 <sup>A</sup>	85,10±1,45 <sup>cd</sup>	88,78±1,96 <sup>AB</sup>	96,45±2,05 <sup>a</sup>	85,94±1,63 <sup>AB</sup>	93,29±1,89 <sup>ab</sup>	83,73±2,23 <sup>B</sup>	88,79±2,06 <sup>bc</sup>	69,88±1,86 <sup>C</sup>	80,99±1,37 <sup>d</sup>
24h	69,75±3,23 <sup>A</sup>	87,08±2,09 <sup>a</sup>	71,93±2,57 <sup>A</sup>	86,65±1,82 <sup>a</sup>	57,32±2,78 <sup>B</sup>	85,83±1,82 <sup>a</sup>	51,78±3,62 <sup>B</sup>	86,63±1,68 <sup>a</sup>	61,94±1,92 <sup>AB</sup>	74,32±1,52 <sup>b</sup>
48h	27,32±2,32 <sup>BC</sup>	74,94±1,90 <sup>ab</sup>	17,36±2,06 <sup>D</sup>	75,63±2,52 <sup>a</sup>	20,36±2,67 <sup>CD</sup>	71,60±1,67 <sup>ab</sup>	30,24±2,21 <sup>B</sup>	78,78±1,91 <sup>a</sup>	60,05±2,75 <sup>A</sup>	66,79±1,98 <sup>b</sup>
72h	25,12±1,69 <sup>B</sup>	59,56±2,09 <sup>c*</sup>	-	73,43±1,51 <sup>b</sup>	26,93±4,40 <sup>B</sup>	74,27±2,80 <sup>ab*</sup>	30,24±3,18 <sup>B</sup>	81,99±1,97 <sup>a</sup>	54,99±3,30 <sup>A</sup>	60,37±2,35 <sup>c</sup>
96h	-	58,18±3,46 <sup>b</sup>	-	73,34±1,84 <sup>a</sup>	-	67,60±1,29 <sup>ab</sup>	22,23±3,01 <sup>B</sup>	61,88±4,73 <sup>b</sup>	54,74±5,31 <sup>A</sup>	60,76±2,73 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-d) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 35. Médias dos valores de velocidade curvilinear (VCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	164,10±3,33 <sup>A</sup>	129,59±2,14 <sup>c</sup>	158,40±4,32 <sup>AB</sup>	166,31±4,78 <sup>a</sup>	156,39±3,52 <sup>AB</sup>	155,37±3,59 <sup>ab</sup>	148,69±4,42 <sup>B</sup>	149,05±4,25 <sup>b</sup>	123,61±2,87 <sup>C</sup>	132,16±2,76 <sup>c</sup>
24h	125,10±6,40 <sup>AB</sup>	149,10±3,93 <sup>a</sup>	130,95±4,41 <sup>A</sup>	138,13±4,74 <sup>a</sup>	105,48±4,92 <sup>DC</sup>	145,54±3,73 <sup>a</sup>	95,11±7,20 <sup>C</sup>	146,84±3,14 <sup>a</sup>	118,43±3,70 <sup>AB</sup>	118,68±2,55 <sup>b</sup>
48h	47,11±4,06 <sup>BC</sup>	126,91±3,63 <sup>ab</sup>	30,23±3,66 <sup>C</sup>	129,88±4,79 <sup>a</sup>	36,28±4,84 <sup>C</sup>	113,34±3,37 <sup>b</sup>	58,24±4,47 <sup>B</sup>	132,21±3,73 <sup>a</sup>	105,42±4,84 <sup>A</sup>	112,85±3,92 <sup>b</sup>
72h	41,79±3,44 <sup>B</sup>	101,02±3,25 <sup>b*</sup>	-	126,77±2,76 <sup>a</sup>	45,40±7,72 <sup>B</sup>	125,40±5,83 <sup>a*</sup>	46,86±5,13 <sup>B</sup>	137,91±4,16 <sup>a</sup>	97,37±6,17 <sup>A</sup>	99,91±4,75 <sup>b</sup>
96h	-	97,01±5,71 <sup>b</sup>	-	118,91±2,68 <sup>a</sup>	-	104,11±2,80 <sup>ab</sup>	30,94±3,99 <sup>B</sup>	103,26±7,85 <sup>ab</sup>	96,00±9,24 <sup>A</sup>	102,12±4,73 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 36. Médias dos valores de velocidade linear progressiva (VSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	58,82±1,15 <sup>A</sup>	58,50±1,27 <sup>c</sup>	57,23±1,49 <sup>A</sup>	68,18±1,67 <sup>a</sup>	54,60±1,02 <sup>A</sup>	67,66±1,67 <sup>a</sup>	48,86±1,35 <sup>B</sup>	64,64±1,73 <sup>b</sup>	43,61±2,10 <sup>B</sup>	59,17±1,17 <sup>bc</sup>
24h	42,06±1,99 <sup>A</sup>	61,02±1,92 <sup>a</sup>	42,39±1,66 <sup>A</sup>	62,56±1,41 <sup>a</sup>	32,20±1,57 <sup>B</sup>	61,03±1,60 <sup>a</sup>	29,34±1,95 <sup>B</sup>	62,69±1,61 <sup>a</sup>	34,93±1,43 <sup>D</sup>	54,54±1,50 <sup>b</sup>
48h	16,10±1,32 <sup>BC</sup>	49,53±1,15 <sup>b</sup>	10,74±1,30 <sup>C</sup>	50,44±1,62 <sup>ab</sup>	12,07±1,62 <sup>C</sup>	47,18±0,77 <sup>b</sup>	18,12±1,28 <sup>B</sup>	55,36±1,53 <sup>a</sup>	34,74±1,56 <sup>A</sup>	46,39±1,84 <sup>b</sup>
72h	14,89±0,98 <sup>B</sup>	39,27±1,61 <sup>**</sup>	-	49,00±1,12 <sup>b</sup>	15,53±2,68 <sup>B</sup>	50,58±1,89 <sup>ab*</sup>	18,47±1,95 <sup>B</sup>	55,42±1,27 <sup>a</sup>	30,01±1,73 <sup>a</sup>	40,93±1,64 <sup>c</sup>
96h	-	38,67±2,41 <sup>b</sup>	-	50,09±1,53 <sup>a</sup>	-	46,79±1,01 <sup>ab</sup>	15,77±2,17 <sup>B</sup>	41,18±3,21 <sup>b</sup>	33,31±3,25 <sup>A</sup>	42,08±2,09 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 37. Médias dos valores de retilinearidade (STR) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,64±0,01 <sup>A</sup>	0,68±0,01 <sup>b</sup>	0,64±0,01 <sup>A</sup>	0,70±0,006 <sup>b</sup>	0,63±0,007 <sup>A</sup>	0,43±0,007 <sup>a</sup>	0,82±0,006 <sup>B</sup>	0,71±0,005 <sup>a</sup>	0,60±0,01 <sup>AB</sup>	0,72±0,005 <sup>a</sup>
24h	0,57±0,02 <sup>A</sup>	0,69±0,01 <sup>a</sup>	0,058±0,006 <sup>A</sup>	0,71±0,008 <sup>a</sup>	0,51±0,02 <sup>AB</sup>	0,70±0,008 <sup>a</sup>	0,48±0,03 <sup>B</sup>	0,71±0,007 <sup>a</sup>	0,56±0,01 <sup>A</sup>	0,72±0,008 <sup>a</sup>
48h	0,45±0,03 <sup>AB</sup>	0,66±0,007 <sup>a</sup>	0,35±0,04 <sup>BC</sup>	0,66±0,007 <sup>a</sup>	0,31±0,04 <sup>C</sup>	0,67±0,02 <sup>a</sup>	0,48±0,03 <sup>A</sup>	0,69±0,006 <sup>a</sup>	0,56±0,02 <sup>A</sup>	0,68±0,01 <sup>a</sup>
72h	0,60±0,03 <sup>A</sup>	0,65±0,01 <sup>a</sup>	-	0,66±0,0069 <sup>a</sup>	0,47±0,08 <sup>A</sup>	0,68±0,0089 <sup>**</sup>	0,42±0,04 <sup>A</sup>	0,67±0,0084 <sup>a</sup>	0,50±0,02 <sup>A</sup>	0,66±0,01 <sup>a</sup>
96h	-	0,64±0,02 <sup>a</sup>	-	0,67±0,008 <sup>a</sup>	-	0,68±0,007 <sup>a</sup>	0,41±0,05 <sup>A</sup>	0,52±0,04 <sup>b</sup>	0,45±0,04 <sup>A</sup>	0,66±0,02 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 38. Médias dos valores de linearidade (LIN) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,35±0,006 <sup>AB</sup>	0,45±0,01 <sup>a</sup>	0,35±0,006 <sup>A</sup>	0,41±0,009 <sup>b</sup>	0,35±0,006 <sup>AB</sup>	0,43±0,007 <sup>ab</sup>	0,32±0,006 <sup>B</sup>	0,43±0,006 <sup>ab</sup>	0,34±0,01 <sup>AB</sup>	0,44±0,006 <sup>ab</sup>
24h	0,32±0,01 <sup>A</sup>	0,40±0,008 <sup>c</sup>	0,31±0,005 <sup>A</sup>	0,47±0,02 <sup>a</sup>	0,28±0,01 <sup>A</sup>	0,4±0,008 <sup>bc</sup>	0,28±0,02 <sup>A</sup>	0,42±0,006 <sup>bc</sup>	0,29±0,007 <sup>A</sup>	0,45±0,008 <sup>ab</sup>
48h	0,27±0,02 <sup>AB</sup>	0,39±0,006 <sup>b</sup>	0,21±0,03 <sup>BC</sup>	0,39±0,008 <sup>b</sup>	0,18±0,02 <sup>C</sup>	0,44±0,02 <sup>a</sup>	0,26±0,02 <sup>ABC</sup>	0,41±0,006 <sup>ab</sup>	0,32±0,01 <sup>A</sup>	0,41±0,01 <sup>ab</sup>
72h	0,37±0,03 <sup>A</sup>	0,38±0,0092 <sup>a</sup>	-	0,39±0,0083 <sup>a</sup>	0,30±0,07 <sup>A</sup>	0,41±0,01 <sup>a*</sup>	0,29±0,03 <sup>A</sup>	0,41±0,0097 <sup>a</sup>	0,29±0,02 <sup>A</sup>	0,43±0,02 <sup>a</sup>
96h	-	0,40±0,02 <sup>a</sup>	-	0,42±0,01 <sup>a</sup>	-	0,46±0,01 <sup>a</sup>	0,30±0,04 <sup>A</sup>	0,31±0,02 <sup>b</sup>	0,26±0,02 <sup>A</sup>	0,40±0,02 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 39. Médias dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,55±0,005 <sup>A</sup>	0,66±0,01 <sup>a</sup>	0,56±0,005 <sup>A</sup>	0,58±0,007 <sup>b</sup>	0,54±0,004 <sup>A</sup>	0,59±0,006 <sup>b</sup>	0,56±0,005 <sup>A</sup>	0,59±0,005 <sup>b</sup>	0,56±0,008 <sup>A</sup>	0,61±0,005 <sup>b</sup>
24h	0,54±0,02 <sup>AB</sup>	0,58±0,005 <sup>b</sup>	0,54±0,004 <sup>A</sup>	0,65±0,02 <sup>a</sup>	0,49±0,02 <sup>AB</sup>	0,58±0,006 <sup>b</sup>	0,47±0,03 <sup>B</sup>	0,58±0,004 <sup>b</sup>	0,52±0,005 <sup>AB</sup>	0,62±0,005 <sup>a</sup>
48h	0,44±0,03 <sup>AB</sup>	0,58±0,004 <sup>b</sup>	0,33±0,04 <sup>BC</sup>	0,58±0,006 <sup>b</sup>	2,30±0,04 <sup>C</sup>	0,65±0,01 <sup>a</sup>	0,42±0,03 <sup>B</sup>	0,59±0,005 <sup>b</sup>	0,54±0,02 <sup>A</sup>	0,59±0,007 <sup>b</sup>
72h	0,61±0,03 <sup>A</sup>	0,58±0,0073 <sup>b</sup>	-	0,58±0,0073 <sup>b</sup>	0,49±0,08 <sup>A</sup>	0,60±0,0089 <sup>ab*</sup>	0,45±0,04 <sup>A</sup>	0,59±0,0068 <sup>ab</sup>	0,51±0,02 <sup>A</sup>	0,62±0,02 <sup>a</sup>
96h	-	0,59±0,02 <sup>ab</sup>	-	0,61±0,009 <sup>ab</sup>	-	0,66±0,01 <sup>a</sup>	0,41±0,05 <sup>A</sup>	0,47±0,04 <sup>c</sup>	0,42±0,04 <sup>A</sup>	0,58±0,02 <sup>b</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 40. Médias dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	4,20±0,07 <sup>AB</sup>	3,13±0,11 <sup>c</sup>	4,26±0,09 <sup>A</sup>	4,23±0,14 <sup>a</sup>	4,16±0,09 <sup>AB</sup>	4,13±0,09 <sup>a</sup>	3,91±0,10 <sup>B</sup>	3,86±0,12 <sup>ab</sup>	3,21±0,07 <sup>C</sup>	3,50±0,07 <sup>bc</sup>
24h	3,60±0,16 <sup>AB</sup>	4,30±0,09 <sup>a</sup>	3,95±0,09 <sup>A</sup>	3,64±0,17 <sup>b</sup>	3,31±0,15 <sup>BC</sup>	4,21±0,10 <sup>a</sup>	2,89±0,19 <sup>C</sup>	4,18±0,08 <sup>a</sup>	3,54±0,07 <sup>AB</sup>	3,68±0,07 <sup>b</sup>
48h	1,63±0,13 <sup>C</sup>	3,66±0,06 <sup>a</sup>	1,35±0,17 <sup>C</sup>	3,53±0,10 <sup>a</sup>	1,49±0,19 <sup>C</sup>	3,01±0,11 <sup>b</sup>	2,22±0,15 <sup>B</sup>	3,61±0,08 <sup>a</sup>	2,86±0,11 <sup>A</sup>	3,11±0,11 <sup>b</sup>
72h	2,04±0,18 <sup>AB</sup>	3,11±0,05 <sup>b*</sup>	-	3,39±0,06 <sup>ab</sup>	2,06±0,40 <sup>AB</sup>	3,35±0,11 <sup>ab*</sup>	1,66±0,17 <sup>B</sup>	3,64±0,08 <sup>a</sup>	2,83±0,15 <sup>A</sup>	2,72±0,11 <sup>c</sup>
96h	-	3,12±0,13 <sup>a</sup>	-	3,14±0,06 <sup>a</sup>	-	2,82±0,11 <sup>a</sup>	1,11±0,16 <sup>B</sup>	2,75±0,21 <sup>a</sup>	2,69±0,25 <sup>A</sup>	2,87±0,11 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 41. Médias dos valores de frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma S100 nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	29,88±0,29 <sup>A</sup>	32,36±0,41 <sup>a</sup>	29,70±0,25 <sup>A</sup>	29,28±0,11 <sup>bc</sup>	28,24±0,27 <sup>B</sup>	30,22±0,13 <sup>b</sup>	28,38±0,34 <sup>B</sup>	30,63±0,19 <sup>b</sup>	27,87±0,33 <sup>B</sup>	29,21±0,22 <sup>c</sup>
24h	26,90±0,80 <sup>AB</sup>	29,37±0,13 <sup>b</sup>	28,51±0,30 <sup>A</sup>	30,71±0,34 <sup>a</sup>	24,52±1,09 <sup>BC</sup>	29,76±0,15 <sup>b</sup>	21,82±1,31 <sup>C</sup>	29,40±0,17 <sup>b</sup>	26,11±0,31 <sup>AB</sup>	30,210±0,24 <sup>ab</sup>
48h	19,17±0,45 <sup>B</sup>	29,06±0,20 <sup>b</sup>	13,44±1,59 <sup>C</sup>	29,54±0,29 <sup>ab</sup>	13,25±1,63 <sup>C</sup>	30,38±0,26 <sup>a</sup>	20,00±1,30 <sup>AB</sup>	30,00±0,17 <sup>ab</sup>	24,91±0,75 <sup>A</sup>	29,82±0,39 <sup>ab</sup>
72h	18,38±1,04 <sup>C</sup>	28,06±0,47 <sup>b*</sup>	-	30,36±0,23 <sup>a</sup>	22,74±3,90 <sup>B</sup>	30,02±0,29 <sup>ab*</sup>	18,98±1,79 <sup>C</sup>	31,14±0,24 <sup>a</sup>	25,20±1,24 <sup>A</sup>	28,55±0,69 <sup>b</sup>
96h	-	29,46±0,13 <sup>ab</sup>	-	32,28±0,38 <sup>a</sup>	-	31,38±0,32 <sup>a</sup>	15,79±2,04 <sup>B</sup>	5,27±1,89 <sup>b</sup>	22,94±2,08 <sup>A</sup>	29,44±1,10 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 42. Médias dos valores de motilidade total (MT) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	72,14±1,25 <sup>A</sup>	81,71±0,96 <sup>a</sup>	75,47±1,34 <sup>A</sup>	79,36±1,01 <sup>ab</sup>	74,39±1,34 <sup>A</sup>	77,29±1,01 <sup>b</sup>	73,43±2,08 <sup>A</sup>	79,69±0,89 <sup>ab</sup>	76,035±0,76 <sup>A</sup>	82,99±0,94 <sup>a</sup>
24h	46,82±4,59 <sup>B</sup>	75,13±0,85 <sup>b</sup>	57,21±3,30 <sup>AB</sup>	75,09±1,22 <sup>b</sup>	63,19±3,61 <sup>A</sup>	77,28±0,89 <sup>ab</sup>	60,73±3,22 <sup>AB</sup>	74,07±1,61 <sup>b</sup>	63,51±3,03 <sup>A</sup>	80,03±0,84 <sup>a</sup>
48h	26,33±2,86 <sup>C</sup>	49,04±2,42 <sup>b</sup>	37,48±3,43 <sup>BC</sup>	63,85±1,97 <sup>a</sup>	50,03±3,89 <sup>AB</sup>	63,02±2,52 <sup>a</sup>	54,82±3,87 <sup>A</sup>	61,41±2,95 <sup>a</sup>	57,10±2,53 <sup>A</sup>	62,66±2,16 <sup>a</sup>
72h	24,45±0,79 <sup>CD</sup>	38,93±2,19 <sup>b*</sup>	16,69±2,02 <sup>D</sup>	51,75±2,63 <sup>a*</sup>	29,68±2,02 <sup>C</sup>	54,962,76 <sup>a*</sup>	40,99±3,22 <sup>B</sup>	60,05±1,79 <sup>a*</sup>	51,76±1,59 <sup>A</sup>	56,89±2,21 <sup>a</sup>
96h	-	33,04±1,96 <sup>c</sup>	13,24±2,46 <sup>C</sup>	44,08±3,47 <sup>b</sup>	24,47±1,69 <sup>B</sup>	49,24±2,84 <sup>ab</sup>	42,52±3,01 <sup>A</sup>	56,83±1,04 <sup>a</sup>	41,32±2,20 <sup>A</sup>	53,32±1,09 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 43. Médias dos valores de distância média da trajetória (DAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	40,24±0,87 <sup>A</sup>	40,12±0,80 <sup>a</sup>	35,49±1,04 <sup>B</sup>	39,27±0,60 <sup>a</sup>	41,87±1,37 <sup>A</sup>	38,08±0,84 <sup>ab</sup>	38,18±1,29 <sup>AB</sup>	39,89±0,92 <sup>a</sup>	39,72±0,54 <sup>A</sup>	36,29±0,57 <sup>b</sup>
24h	19,45±1,70 <sup>C</sup>	39,31±1,01 <sup>a</sup>	25,31±1,40 <sup>BC</sup>	38,19±0,71 <sup>abc</sup>	27,62±1,69 <sup>AB</sup>	38,99±1,23 <sup>ab</sup>	30,31±1,28 <sup>AB</sup>	35,39±0,88 <sup>bc</sup>	31,29±1,52 <sup>A</sup>	34,86±0,79 <sup>c</sup>
48h	9,97±0,92 <sup>C</sup>	33,46±1,27 <sup>a</sup>	15,17±1,38 <sup>BC</sup>	35,72±0,97 <sup>a</sup>	19,20±1,50 <sup>B</sup>	34,29±0,97 <sup>a</sup>	27,57±2,05 <sup>A</sup>	34,32±1,22 <sup>a</sup>	32,67±1,24 <sup>A</sup>	32,93±0,95 <sup>a</sup>
72h	32,76±1,97 <sup>A</sup>	31,68±1,28 <sup>c</sup>	10,92±0,92 <sup>C</sup>	33,67±1,00 <sup>bc*</sup>	15,39±1,09 <sup>B</sup>	35,83±1,12 <sup>ab*</sup>	18,51±1,46 <sup>B</sup>	38,86±0,88 <sup>a*</sup>	31,67±1,13 <sup>A</sup>	33,13±1,11 <sup>bc</sup>
96h	-	28,65±1,18 <sup>c</sup>	6,23±0,14 <sup>D</sup>	27,16±1,03 <sup>c</sup>	18,80±1,22 <sup>C</sup>	33,54±0,71 <sup>ab</sup>	27,15±1,01 <sup>B</sup>	35,91±0,94 <sup>a</sup>	32,72±1,28 <sup>A</sup>	30,15±0,54 <sup>bc</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 44. Médias dos valores de distância curvilinear (DCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	69,57±1,44 <sup>AB</sup>	65,80±1,66 <sup>a</sup>	61,85±2,06 <sup>C</sup>	61,46±1,11 <sup>ab</sup>	76,85±2,70 <sup>A</sup>	61,22±1,62 <sup>ab</sup>	66,98±2,24 <sup>BC</sup>	63,79±2,13 <sup>ab</sup>	73,50±0,94 <sup>AB</sup>	58,52±1,21 <sup>b</sup>
24h	32,10±2,94 <sup>CA</sup>	65,46±1,85 <sup>a</sup>	43,19±2,47 <sup>B</sup>	65,38±1,69 <sup>a</sup>	48,04±2,99 <sup>AB</sup>	66,75±2,42 <sup>a</sup>	52,15±2,46 <sup>AB</sup>	60,48±1,90 <sup>ab</sup>	54,28±2,80 <sup>A</sup>	56,19±1,51 <sup>b</sup>
48h	15,60±1,44 <sup>D</sup>	55,46±2,63 <sup>a</sup>	24,93±2,25 <sup>D</sup>	59,60±1,85 <sup>a</sup>	34,89±2,78 <sup>C</sup>	57,86±1,85 <sup>a</sup>	46,94±3,50 <sup>B</sup>	58,02±2,29 <sup>a</sup>	56,98±2,32 <sup>A</sup>	54,19±1,89 <sup>a</sup>
72h	54,57±3,74 <sup>A</sup>	53,63±2,36 <sup>b</sup>	15,68±1,33 <sup>C</sup>	55,73±2,07 <sup>b*</sup>	25,37±1,85 <sup>B</sup>	60,89±2,11 <sup>ab*</sup>	32,26±2,69 <sup>B</sup>	64,88±1,69 <sup>a*</sup>	57,15±2,53 <sup>A</sup>	54,88±1,97 <sup>b</sup>
96h	-	46,06±2,14 <sup>b</sup>	9,98±1,88 <sup>D</sup>	45,09±1,90 <sup>b</sup>	32,49±2,50 <sup>C</sup>	54,19±1,38 <sup>a</sup>	46,64±1,56 <sup>B</sup>	55,94±1,94 <sup>a</sup>	60,89±2,75 <sup>A</sup>	49,45±0,72 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 45. Médias dos valores de distância linear progressiva (DSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	21,30±0,42 <sup>B</sup>	29,06±0,73 <sup>ab</sup>	20,62±0,58 <sup>B</sup>	26,79±0,38 <sup>bc</sup>	24,45±0,82 <sup>B</sup>	26,60±0,73 <sup>c</sup>	20,94±0,76 <sup>A</sup>	29,35±0,60 <sup>a</sup>	25,73±0,53 <sup>A</sup>	27,30±0,54 <sup>abc</sup>
24h	11,42±0,92 <sup>C</sup>	27,52±0,64 <sup>ab</sup>	14,08±0,69 <sup>BC</sup>	27,04±0,47 <sup>ab</sup>	15,54±0,93 <sup>AB</sup>	27,62±0,92 <sup>a</sup>	16,90±0,83 <sup>AB</sup>	25,55±0,65 <sup>ab</sup>	17,36±0,73 <sup>A</sup>	25,07±0,51 <sup>b</sup>
48h	5,22±0,48 <sup>D</sup>	21,15±0,50 <sup>b</sup>	7,68±0,64 <sup>CD</sup>	23,82±0,43 <sup>a</sup>	10,46±0,81 <sup>C</sup>	23,81±0,67 <sup>a</sup>	14,49±1,06 <sup>B</sup>	22,79±0,74 <sup>ab</sup>	18,99±0,50 <sup>A</sup>	23,39±0,71 <sup>ab</sup>
72h	22,36±1,21 <sup>A</sup>	20,51±0,69 <sup>c</sup>	6,00±0,48 <sup>C</sup>	23,35±0,68 <sup>ab*</sup>	8,34±0,58 <sup>BC</sup>	23,97±0,76 <sup>ab*</sup>	10,61±0,81 <sup>B</sup>	25,86±0,52 <sup>a*</sup>	19,46±0,71 <sup>A</sup>	22,70±0,76 <sup>bc*</sup>
96h	-	19,34±0,82 <sup>bc</sup>	3,34±0,61 <sup>D</sup>	17,78±0,73 <sup>c</sup>	10,37±0,52 <sup>C</sup>	22,92±0,46 <sup>a</sup>	15,42±0,53 <sup>B</sup>	23,55±0,60 <sup>a</sup>	19,99±0,74 <sup>A</sup>	21,29±0,55 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 46. Médias dos valores de velocidade média da trajetória (VAP) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	88,88±1,57 <sup>AB</sup>	89,89±1,78 <sup>a</sup>	79,14±2,55 <sup>C</sup>	86,46±1,29 <sup>ab</sup>	94,40±2,96 <sup>A</sup>	84,05±1,74 <sup>ab</sup>	84,68±2,2,85 <sup>BC</sup>	89,03±2,13 <sup>a</sup>	88,64±1,21 <sup>AB</sup>	80,57±1,15 <sup>b</sup>
24h	43,66±3,79 <sup>C</sup>	88,16±2,24 <sup>a</sup>	56,44±3,17 <sup>BC</sup>	85,91±1,63 <sup>ab</sup>	62,90±3,93 <sup>AB</sup>	87,48±2,73 <sup>a</sup>	67,41±2,83 <sup>AB</sup>	78,38±1,99 <sup>bc</sup>	70,19±3,41 <sup>A</sup>	77,49±1,68 <sup>c</sup>
48h	25,67±2,0 <sup>D</sup>	73,78±2,86 <sup>a</sup>	32,49±2,93 <sup>CD</sup>	79,06±2,05 <sup>a</sup>	42,47±3,30 <sup>C</sup>	76,39±2,12 <sup>a</sup>	60,34±4,44 <sup>B</sup>	76,87±2,66 <sup>a</sup>	74,42±2,84 <sup>A</sup>	72,09±2,06 <sup>a</sup>
72h	71,32±4,64 <sup>A</sup>	69,64±2,63 <sup>c</sup>	24,52±1,98 <sup>C</sup>	74,41±2,19 <sup>bc*</sup>	33,26±2,34 <sup>BC</sup>	79,59±2,49 <sup>ab*</sup>	42,39±3,34 <sup>B</sup>	85,18±1,85 <sup>a*</sup>	70,89±2,48 <sup>A</sup>	72,86±2,30 <sup>bc</sup>
96h	-	62,66±2,40 <sup>c</sup>	14,13±2,57 <sup>D</sup>	60,91±2,13 <sup>c</sup>	41,09±2,54 <sup>C</sup>	73,32±1,51 <sup>ab</sup>	58,65±2,20 <sup>B</sup>	77,46±2,07 <sup>a</sup>	72,83±2,78 <sup>A</sup>	66,64±1,14 <sup>bc</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 47. Médias dos valores de velocidade curvilinear (VCL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	153,29±3,14 <sup>BC</sup>	147,25±3,72 <sup>a</sup>	137,57±4,94 <sup>C</sup>	135,28±2,52 <sup>ab</sup>	172,42±5,81 <sup>A</sup>	135,13±3,46 <sup>ab</sup>	148,22±5,03 <sup>BC</sup>	142,25±4,85 <sup>ab</sup>	163,36±2,20 <sup>AB</sup>	129,76±2,52 <sup>b</sup>
24h	71,90±6,58 <sup>C</sup>	146,68±4,10 <sup>a</sup>	96,03±5,52 <sup>B</sup>	146,98±3,86 <sup>a</sup>	108,98±6,94 <sup>AB</sup>	149,49±5,41 <sup>a</sup>	115,95±95 <sup>AB</sup>	133,81±4,30 <sup>ab</sup>	121,65±6,28 <sup>A</sup>	124,78±3,23 <sup>b</sup>
48h	33,82±3,12 <sup>D</sup>	122,20±5,89 <sup>a</sup>	53,28±4,77 <sup>D</sup>	131,69±3,93 <sup>a</sup>	76,59±6,06 <sup>C</sup>	128,60±4,09 <sup>a</sup>	102,50±7,57 <sup>B</sup>	129,78±5,05 <sup>a</sup>	127,79±5,32 <sup>A</sup>	118,24±4,06 <sup>a</sup>
72h	118,86±8,56 <sup>A</sup>	117,43±4,89 <sup>bc</sup>	35,19±2,88 <sup>D</sup>	122,95±4,54 <sup>bc*</sup>	54,59±3,91 <sup>C</sup>	135,02±4,69 <sup>ab*</sup>	73,41±6,11 <sup>B</sup>	142,00±3,59 <sup>a*</sup>	127,49±5,45 <sup>A</sup>	120,31±4,13 <sup>bc</sup>
96h	-	100,49±4,48 <sup>b</sup>	22,51±4,23 <sup>D</sup>	100,71±3,93 <sup>b</sup>	70,89±5,26 <sup>C</sup>	118,17±3,02 <sup>a</sup>	100,66±3,49 <sup>B</sup>	120,73±4,32 <sup>a</sup>	135,02±5,88 <sup>A</sup>	109,12±1,48 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsc

Tabela 48. Médias dos valores de velocidade linear progressiva (VSL) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	47,27±0,89 <sup>B</sup>	65,02±1,58 <sup>ab</sup>	46,08±1,40 <sup>B</sup>	59,18±0,82 <sup>c</sup>	55,35±1,78 <sup>A</sup>	58,78±1,53 <sup>c</sup>	46,74±1,71 <sup>B</sup>	65,50±1,39 <sup>a</sup>	57,42±1,15 <sup>A</sup>	60,54±1,09 <sup>bc</sup>
24h	25,70±2,06 <sup>C</sup>	61,70±1,43 <sup>a</sup>	31,49±1,56 <sup>BC</sup>	60,79±1,03 <sup>ab</sup>	35,54±2,17 <sup>AB</sup>	61,89±2,02 <sup>a</sup>	37,78±1,84 <sup>AB</sup>	56,50±1,44 <sup>ab</sup>	37,18±1,66 <sup>A</sup>	55,69±1,10 <sup>b</sup>
48h	11,50±1,07 <sup>D</sup>	46,83±1,10 <sup>b</sup>	16,60±1,38 <sup>D</sup>	52,94±0,92 <sup>a</sup>	23,34±1,80 <sup>C</sup>	53,02±1,44 <sup>a</sup>	31,99±2,32 <sup>B</sup>	51,21±1,61 <sup>ab</sup>	42,88±1,22 <sup>A</sup>	51,31±1,55 <sup>ab</sup>
72h	48,68±2,89 <sup>A</sup>	45,32±1,41 <sup>c</sup>	13,74±1,08 <sup>C</sup>	51,66±1,48 <sup>ab*</sup>	18,14±1,24 <sup>C</sup>	53,31±1,67 <sup>ab*</sup>	24,51±1,88 <sup>B</sup>	56,83±1,09 <sup>a*</sup>	43,71±1,58 <sup>bc</sup>	50,04±1,57 <sup>A*</sup>
96h	-	42,42±1,66 <sup>bc</sup>	7,71±1,41 <sup>D</sup>	40,16±1,54 <sup>c</sup>	23,07±1,11 <sup>C</sup>	50,22±0,95 <sup>a</sup>	33,48±1,15 <sup>B</sup>	50,95±1,30 <sup>a</sup>	44,59±1,63 <sup>A</sup>	47,14±1,16 <sup>ab</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 49. Médias dos valores de retilinearidade (STR) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,53±0,005 <sup>C</sup>	0,71±0,008 <sup>ab</sup>	0,58±0,005 <sup>B</sup>	0,68±0,009 <sup>c</sup>	0,58±0,004 <sup>B</sup>	0,69±0,008 <sup>bc</sup>	0,54±0,009 <sup>C</sup>	0,73±0,006 <sup>a</sup>	0,64±0,008 <sup>A</sup>	0,74±0,005 <sup>a</sup>
24h	0,51±0,04 <sup>A</sup>	0,69±0,006 <sup>a</sup>	0,56±0,02 <sup>A</sup>	0,70±0,003 <sup>a</sup>	0,52±0,02 <sup>A</sup>	0,70±0,009 <sup>a</sup>	0,53±0,02 <sup>A</sup>	0,71±0,005 <sup>a</sup>	0,56±0,01 <sup>A</sup>	0,71±0,0070 <sup>a</sup>
48h	0,36±0,03 <sup>B</sup>	0,66±0,01 <sup>b</sup>	0,42±0,03 <sup>B</sup>	0,68±0,01 <sup>ab</sup>	0,44±0,03 <sup>B</sup>	0,69±0,006 <sup>ab</sup>	0,43±0,03 <sup>B</sup>	0,66±0,007 <sup>b</sup>	0,60±0,01 <sup>A</sup>	0,70±0,006 <sup>a</sup>
72h	0,68±0,01 <sup>A</sup>	0,66±0,0081 <sup>b</sup>	0,45±0,04 <sup>B</sup>	0,69±0,0060 <sup>a*</sup>	0,45±0,03 <sup>B</sup>	0,67±0,0057 <sup>a</sup> *	0,47±0,03 <sup>B</sup>	0,67±0,0083 <sup>ab*</sup>	0,61±0,0079 <sup>A</sup>	0,68±0,0077 <sup>ab*</sup>
96h	-	0,67±0,009 <sup>ab</sup>	0,25±0,05 <sup>B</sup>	0,65±0,008 <sup>b</sup>	0,57±0,02 <sup>A</sup>	0,40,69±0,008 <sup>ab</sup>	0,57±0,009 <sup>A</sup>	0,65±0,008 <sup>b</sup>	0,61±0,01 <sup>A</sup>	0,69±0,006 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-C) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 50. Médias dos valores de linearidade (LIN) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,30±0,002 <sup>B</sup>	0,44±0,009 <sup>ab</sup>	0,33±0,004 <sup>A</sup>	0,44±0,01 <sup>ab</sup>	0,31±0,002 <sup>B</sup>	0,44±0,01 <sup>b</sup>	0,30±0,003 <sup>B</sup>	0,48±0,01 <sup>a</sup>	0,37±0,007 <sup>A</sup>	0,46±0,006 <sup>ab</sup>
24h	0,33±0,03 <sup>A</sup>	0,42±0,005 <sup>ab</sup>	0,35±0,02 <sup>A</sup>	0,41±0,008 <sup>b</sup>	0,31±0,02 <sup>A</sup>	0,41±0,009 <sup>b</sup>	0,31±0,008 <sup>A</sup>	0,42±0,005 <sup>ab</sup>	0,33±0,01 <sup>A</sup>	0,44±0,008 <sup>a</sup>
48h	0,23±0,02 <sup>B</sup>	0,42±0,02 <sup>a</sup>	0,26±0,02 <sup>B</sup>	0,41±0,009 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>B</sup>	0,41±0,008 <sup>a</sup>	0,25±0,02 <sup>B</sup>	0,39±0,007 <sup>a</sup>	0,34±0,008 <sup>A</sup>	0,43±0,008 <sup>a</sup>
72h	0,41±0,01 <sup>A</sup>	0,39±0,0079 <sup>a</sup>	0,32±0,03 <sup>AB</sup>	0,43±0,0094 <sup>**</sup>	0,28±0,02 <sup>B</sup>	0,39±0,0075 <sup>a*</sup>	0,28±0,02 <sup>AB</sup>	0,40±0,0084 <sup>a*</sup>	0,35±0,0070 <sup>AB</sup>	0,42±0,0099 <sup>a*</sup>
96h	-	0,43±0,02 <sup>a</sup>	0,16±0,03 <sup>B</sup>	0,39±0,009 <sup>a</sup>	0,35±0,02 <sup>A</sup>	0,42±0,009 <sup>a</sup>	0,33±0,007 <sup>A</sup>	0,43±0,02 <sup>a</sup>	0,34±0,01 <sup>A</sup>	0,42±0,008 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-B) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 51. Médias dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
3h	0,57±0,004 <sup>A</sup>	0,61±0,006 <sup>a</sup>	0,57±0,006 <sup>A</sup>	0,64±0,009 <sup>a</sup>	0,54±0,004 <sup>B</sup>	0,63±0,01 <sup>a</sup>	0,56±0,005 <sup>A</sup>	0,64±0,01 <sup>a</sup>	0,53±0,005 <sup>B</sup>	0,62±0,004 <sup>a</sup>
24h	0,52±0,04 <sup>A</sup>	0,59±0,002 <sup>b</sup>	0,58±0,02 <sup>A</sup>	0,58±0,006 <sup>b</sup>	0,53±0,02 <sup>A</sup>	0,58±0,006 <sup>b</sup>	0,57±0,02 <sup>A</sup>	0,58±0,004 <sup>b</sup>	0,58±0,01 <sup>A</sup>	0,62±0,005 <sup>a</sup>
48h	0,43±0,04 <sup>B</sup>	0,62±0,01 <sup>a</sup>	0,48±0,03 <sup>AB</sup>	0,60±0,005 <sup>a</sup>	0,45±0,03 <sup>B</sup>	0,59±0,006 <sup>a</sup>	0,47±0,03 <sup>AB</sup>	0,59±0,005 <sup>a</sup>	0,57±0,006 <sup>A</sup>	0,61±0,006 <sup>a</sup>
72h	0,59±0,01 <sup>A</sup>	0,59±0,0057 <sup>a</sup>	0,55±0,04 <sup>A</sup>	0,61±0,0083 <sup>a</sup>	0,50±0,03 <sup>A</sup>	0,59±0,0068 <sup>a*</sup>	0,47±0,03 <sup>A</sup>	0,59±0,0057 <sup>a*</sup>	0,56±0,0077 <sup>A</sup>	0,61±0,0076 <sup>a*</sup>
96h	-	0,63±0,02 <sup>ab</sup>	0,29±0,05 <sup>B</sup>	0,60±0,009 <sup>b</sup>	0,60±0,02 <sup>A</sup>	0,62±0,007 <sup>ab</sup>	0,57±0,007 <sup>A</sup>	0,65±0,02 <sup>ab</sup>	0,54±0,009 <sup>A</sup>	0,60±0,006 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-B) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,0$

Tabela 52. Médias dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
<b>3h</b>	3,94±0,08 <sup>BC</sup>	3,83±0,11 <sup>a</sup>	3,48±0,13 <sup>D</sup>	3,37±0,09 <sup>ba</sup>	4,40±0,08 <sup>CD</sup>	3,50±0,11 <sup>ab</sup>	3,78±0,98 <sup>A</sup>	3,66±0,13 <sup>ab</sup>	4,16±0,05 <sup>AB</sup>	3,58±0,07 <sup>ab</sup>
<b>24h</b>	2,53±0,21 <sup>B</sup>	4,17±0,06 <sup>a</sup>	3,03±0,16 <sup>AB</sup>	4,16±0,08 <sup>a</sup>	3,35±0,20 <sup>A</sup>	4,09±0,10 <sup>a</sup>	3,47±0,15 <sup>A</sup>	3,98±0,12 <sup>ab</sup>	3,60±0,14 <sup>A</sup>	3,73±0,06 <sup>b</sup>
<b>48h</b>	1,16±0,11 <sup>C</sup>	3,26±0,14 <sup>ab</sup>	1,58±0,13 <sup>C</sup>	3,54±0,08 <sup>ab</sup>	2,30±0,17 <sup>B</sup>	3,63±0,10 <sup>a</sup>	2,74±0,19 <sup>B</sup>	3,61±0,10 <sup>a</sup>	3,61±0,13 <sup>A</sup>	3,18±0,09 <sup>b</sup>
<b>72h</b>	3,27±0,16 <sup>AB</sup>	3,43±0,08 <sup>ab</sup>	1,50±0,13 <sup>C</sup>	3,39±0,09 <sup>ab*</sup>	1,66±0,12 <sup>C</sup>	3,64±0,09 <sup>ab*</sup>	2,74±0,19 <sup>B</sup>	3,66±0,06 <sup>a*</sup>	3,67±0,12 <sup>A*</sup>	3,32±0,07 <sup>b</sup>
<b>96h</b>	-	2,66±0,14 <sup>b</sup>	1,08±0,21 <sup>C</sup>	3,23±0,07 <sup>a</sup>	2,18±0,14 <sup>B</sup>	3,19±0,06 <sup>a</sup>	2,66±0,11 <sup>B</sup>	2,91±0,14 <sup>ab</sup>	3,73±0,13 <sup>A</sup>	3,09±0,05 <sup>a</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

Tabela 53. Médias dos valores de frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) nos diferentes tempos de avaliação, com o uso das concentrações testadas do lipossoma SCAR nos diluentes de resfriamento Tris-glucose (TG) e plasma de gema de ovo (PL).

Concentração mM	5		3,75		2,5		1,25		0	
Diluente	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL	TG	PL
<b>3h</b>	25,71±0,30 <sup>D</sup>	30,18±0,16 <sup>bc</sup>	27,63±0,42 <sup>AB</sup>	32,21±0,37 <sup>a</sup>	27,12±0,31 <sup>BC</sup>	31,24±0,46 <sup>ab</sup>	26,15±0,35 <sup>CD</sup>	30,70±0,22 <sup>b</sup>	28,89±0,24 <sup>A</sup>	29,52±0,21 <sup>c</sup>
<b>24h</b>	20,12±1,38 <sup>C</sup>	29,16±0,21 <sup>b</sup>	24,10±0,74 <sup>AB</sup>	30,33±0,20 <sup>a</sup>	22,97±1,06 <sup>BC</sup>	29,67±0,18 <sup>ab</sup>	25,83±0,68 <sup>AB</sup>	29,23±0,24 <sup>b</sup>	26,84±0,61 <sup>A</sup>	29,80±0,14 <sup>ab</sup>
<b>48h</b>	16,09±1,48 <sup>C</sup>	29,68±0,28 <sup>b</sup>	19,0±1,39 <sup>BC</sup>	31,12±0,24 <sup>a</sup>	20,21±1,35 <sup>BC</sup>	29,75±0,26 <sup>b</sup>	21,01±1,47 <sup>B</sup>	30,01±0,33 <sup>b</sup>	28,37±0,35 <sup>A</sup>	30,12±0,24 <sup>ab</sup>
<b>72h</b>	32,27±1,18 <sup>A</sup>	28,99±0,49 <sup>b</sup>	17,35±1,39 <sup>B</sup>	30,96±0,31 <sup>a*</sup>	20,74±1,29 <sup>B</sup>	31,17±0,35 <sup>a*</sup>	21,36±1,45 <sup>B</sup>	31,07±0,22 <sup>a*</sup>	29,48±0,26 <sup>A</sup>	31,19±0,34 <sup>a*</sup>
<b>96h</b>	-	31,01±0,71 <sup>bc</sup>	11,29±2,08 <sup>B</sup>	30,37±0,40 <sup>c</sup>	25,61±0,82 <sup>A</sup>	32,11±0,47 <sup>ab</sup>	26,44±0,55 <sup>A</sup>	33,07±0,41 <sup>a</sup>	28,88±0,51 <sup>A</sup>	31,69±0,26 <sup>abc</sup>

Os resultados estão expressos em médias ± D.P.M (n=10). Letras maiúsculas distintas (A-D) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em TRIS-glucose ( $p < 0,05$ ). Letras minúsculas distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos em plasma de gema de ovo ( $p < 0,05$ ). Asterisco\*, indica maior média ( $p < 0,05$ ) na comparação entre as concentrações em TRIS-glucose e plasma de gema de ovo na avaliação em 72h de refrigeração. O símbolo - indica que não havia motilidade total e progressiva na amostra. Fonte: Elaborado pelo autor, 2023.

## **2.2 Artigo 2**

### **Lipossomas de fosfatidilcolina de soja e $\beta$ -caroteno encapsulado melhoram a manutenção do sêmen canino resfriado**

Edenara Anastácio da Silva<sup>1</sup>; Carine Dahl Corcini<sup>1-3</sup>; Fernanda Rodriguez Mendoça<sup>1</sup>; Izani Acosta Bonel<sup>1</sup>; Maria Eduarda Bicca Dode<sup>1</sup>; Nicole Freitas Conçalves<sup>1</sup>; Rodrigo Desessards Jardim<sup>3</sup>; Cristiana Lima Dora<sup>3</sup>; Mariano Michelon<sup>2</sup>; Antonio Sergio Varela Junior<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil

<sup>2</sup>Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil

<sup>3</sup>Reprodução Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil

Será submetido à revista *Research, Society and Development*

## **Lipossomas de fosfatidilcolina de soja e $\beta$ -caroteno encapsulado melhoraram a manutenção do sêmen canino resfriado**

### **RESUMO**

Com intuito de melhorar a eficiência de diluentes de resfriamento seminal, lipossomas contendo 45% (S45), 75% (S75), mais que 98% (S100) de fosfatidilcolina de soja e  $\beta$ -caroteno encapsulado em S45 (SCAR), foram estudados. O diluente plasma de gema de ovo com 5mM; 1,25mM e 0,5mM dos lipossomas foi utilizado no resfriamento do sêmen canino a 5°C, com avaliações após 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) e 96h (D4). Cinética foi avaliada através do sistema automatizado (CASA) e os parâmetros de integridade e funcionalidade celular através de citometria de fluxo. O uso de lipossomas de fosfatidilcolina de soja e  $\beta$ -caroteno encapsulado diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular do sêmen canino refrigerado ( $p < 0,05$ ). A concentração de 0,5mM do lipossoma S75 possibilitou as maiores médias de motilidade total e progressiva dos meios estudados neste experimento ( $p < 0,05$ ). Adicionalmente 0,5mM de SCAR obteve motilidade progressiva, velocidade retilinearidade e linearidade superior ao meio controle ( $p < 0,05$ ).

**PALAVRAS-CHAVE:**  $\beta$ -caroteno encapsulados; lipossomas; criopreservação; cinética espermática; citometria de fluxo.

### **INTRODUÇÃO**

Com a aproximação sentimental do homem com os cães, advento da cinofilia, e interesse no desenvolvimento de biotécnicas para carnívoros silvestres, é necessária a descrição de métodos eficientes para a criopreservação seminal da espécie, além de ser um modelo científico para testes em outras espécies. Atualmente estudos tem salientado manipulação de agentes estabilizadores de membrana, como lipossomas, considerado o sitio primário de dano durante a criopreservação (Belala *et al.*, 2016; Quinn, 1985). Os Lipossomas (LIPO) são vesículas coloidais compostas de lipídeos anfipáticos que em excesso de água se agregam formando bicamadas lipídicas esféricas com compartimento interno aquoso (Balbino *et al.*, 2013).

Com intuito da introdução de um estabilizador de membrana de origem vegetal, lecitinas de soja comerciais em diferentes apresentações e métodos de adição aos diluentes têm sido utilizadas em estudos na criopreservação de seminal de cães com resultados promissores (Beccaglia; Anastasi; Luvoni, 2009; Axnér; Lagerson, 2016; Sánchez-Calabuig *et al.*, 2017; Dalmazzo *et al.*, 2018; Hermansson; Johannesson; Axner, 2021).

O uso de antioxidantes visando minimizar o estresse oxidativo dos espermatozoides tem sido estudado em diversas espécies. No entanto o uso deste apresentam algumas limitações, como baixa durabilidade, solubilidade e estabilidade em meios aquosos (Martinelli *et al.*, 2020). Carotenoides são pigmentos naturais lipossolúveis produzidos em plantas, bactérias e fungos possuem propriedades antioxidantes utilizadas nas industriais alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (Kirti *et al.*, 2014). O uso de diferentes carotenoides tem demonstrado efeitos antioxidantes com eficiente manutenção da viabilidade espermática após a criopreservação em cães (Kirti *et al.*, 2014).

Objetivou-se nesse estudo a análise parâmetros de cinética e funcionalidade espermática dos gametas preservados por até quatro dias sob refrigeração, afim de determinar a melhor concentração e proporção da composição dos LIPO e  $\beta$ -caroteno encapsulados.

## METODOLOGIA

### *Produção dos lipossomas*

Os lipossomas foram confeccionados, a partir de lecitinas de soja desengorduradas com diferentes teores de fosfatidilcolina, comercialmente denominadas Lipoid S45 (>45% m/m fosfatidilcolina, 10–18% m/m fosfatidiletanolamina, <4% m/m lisofosfatidilcolina e <3% m/m triacilgliceróis), Lipoid S75 (>75% m/m fosfatidilcolina, 10–18% m/m fosfatidiletanolamina, <4% m/m lisofosfatidilcolina e <3% w/w triacilgliceróis) e Lipoid S100 (>98% m/m fosfatidilcolina) da Lipoid GmbH (Alemanha). Adicionalmente, foram adicionados 1,56mg/ml de carotenoides microbianos na dispersão etanólica contendo os fosfolipídios do Lipoid S100 (SCAR). Os carotenoides microbianos foram produzidos pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* CCT 7082 através de meios de cultivos de baixo custo (Otero *et al.*, 2019) e (Dias Rodrigues *et al.*, 2019)

A produção das nanovesículas foi realizada pelo método de injeção de etanol, elaborando soluções de 10mM de lipossomas, como descrito por (Michelon *et al.*, 2016).

### *Caracterização dos lipossomas*

Na Tabela 1 esta sumarizada o diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersidade dos lipossomas utilizados nesse estudo. Os parâmetros foram determinados por espalhamento de luz dinâmico, através da técnica de Espectroscopia de Correlação de Fótons utilizando o laser de alta potência do equipamento Zetasizer Nano-ZS (MalvernInstruments, UK). O potencial elétrico dos lipossomas foi avaliado em termos de valores de potencial- $\zeta$ . A determinação do potencial- $\zeta$  dos lipossomas foi realizada utilizando também o equipamento Zetasizer Nano-ZS (MalvernInstruments, UK). A mobilidade eletroforética foi obtida através da técnica de Laser Doppler Velocimetry (LDV), e as conversões das medidas de mobilidade eletroforética em valores de potencial- $\zeta$  foi realizada utilizando o modelo matemático de Smoluchowski.

Tabela 1. Diâmetro médio (Dh), índice de polidispersividade (IPd), Potencial- $\zeta$  e pH dos lipossomas.

Lipossomas	Dh (nm)	IPd (%)	Potencial- $\zeta$ (mV)	pH
S45	150,3 ± 19,7	0,302 ± 0,02	-35,3 ± 1,63	4,67
S75	111,3 ± 7,9	0,416 ± 0,05	-39,8 ± 0,28	5,25
S100	281,9 ± 19,0	0,146 ± 0,06	-9,51 ± 1,83	5,36
SCAR	237,2 ± 5,62	0,12 ± 0,06	-55,19 ± 0,38	7,00

### *Animais*

As amostras foram obtidas de canis particulares da região do estudo. A coleta seminal foi realizada de 10 machos clinicamente saldáveis, Australian Cattle Dog, com idade entre 2 e 6 anos, previamente condicionados à coleta e fertilidade comprovada *in vivo*.

### *Preparo dos diluentes*

O diluente de resfriamento controle, plasma de gema de ovo (PL), foi produzido adicionando-se 40 ml de gema de ovo em 60 mL de Tris-glicose (3,025g de Tris (hidroximetil)-aminometano; 1,25g de glicose; 1,7g de citrato de sódio monohidratado; água destilada *q.s.p.* 100mL; pH: 6,84 e 364mOsm), conforme metodologia descrita por (Corcini *et al.*, 2016).

A produção dos meios de resfriamento (tratamentos) contendo os lipossomas foi realizada conforme descrito por Silva *et al.* (2023), onde uma solução de Tris-glicose contendo S45, S75, S100 e SCAR foi confeccionada e adicionada ao diluente de resfriamento PL (1:1 v/v), para chegar as concentrações de 5mM; 1mM; e 0,5mM de lipossomas, tendo como referência estudos anteriores ainda não publicados.

### *Coleta e processamento seminal*

A segunda fração seminal (rica em espermatozoides) foi obtida através da manipulação digital (Christiansen, 1986). Apenas amostras com motilidade total (MT) superior à 80% foram inclusas neste estudo (n=6). Após a determinação da concentração espermática através da câmara de Neubauer, o ejaculado foi diluído em Tris-glicose, para obtenção da concentração de 200 milhões de espermatozoides móveis/mL. Uma alíquota de cada amostra foi diluída (1:1 v/v) nos diferentes tratamentos e mantida em refrigeração a 5°C por 4 dias.

### *Avaliação da cinética espermática*

As avaliações foram realizadas após 24h (D1), 48h (D2), 72h (D3) e 96h (D4) de refrigeração. Os parâmetros de cinética espermática foram analisados com o sistema automatizado *Computer Assisted Sperm Analysis* (Sperm Vision® 3.5, Minitub, Tiefenbach, Germany), em microscópio de contraste de fase 200 X (AxioScope A1®, Zeiss, Germany). Uma alíquota de 3µL de cada amostra foi colocada entre uma lâmina microscópica e uma lamínula pré-aquecidas a 37°C; a avaliação celular consistia em 150 células por campo, sendo avaliados 6 campos aleatórios. Os parâmetros avaliados neste estudo foram: motilidade total (MT); motilidade progressiva (MP); velocidade curvilínea (VCL); velocidade linear progressiva (VSL); velocidade média da trajetória (VAP); distância curvilínea (DCL); distância linear progressiva (DSL); distância média da trajetória (DAP); retilinearidade (STR); linearidade (LIN); frequência de batimento flagelar cruzado (BCF); coeficiente de oscilação (WOB); amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH).

### *Citometria de Fluxo*

As análises de citometria de fluxo foram realizadas no aparelho Acoustic Focusing Cytometer (Attune®, Califórnia, EUA), equipado de laser azul (Argon 488 nm) e violeta (UV 450 nm). As sondas fluorescentes utilizadas neste estudo foram obtidas da Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). As fluorescências verde, laranja e vermelha foram lidas com fotomultiplicador (PMT) BL1 (filtro 530/30), BL2 (filtro 575/24) e BL3 (filtro > 640), respectivamente. A estabilidade de fluorescência do citômetro foi testada diariamente utilizando solução padrão (Invitrogen, CA, EUA).

Foram selecionados 20,000 eventos espermáticos por amostra, com uma taxa de fluxo de 200 células/s. De forma a determinar a população espermática, debríis celulares e outros eventos não espermáticos foram eliminados com base nos gráficos de dispersão FSC x SSC (PERRY; CORCINI; ANCIUTI; OTTE *et al.*, 2019), através da exposição ao Hoescht 33342 (2 mM), sendo o fluorocromo detectado com PMT VL1 (filtro 450/40). Os resultados foram obtidos com Attune Cytometric Software V 2.1.

### *Fluidez de membrana espermática*

A fluidez da membrana espermática (FLU) foi avaliada utilizando o marcador YO-PRO (1 µM), e Merocyanine 540 (M540) na concentração final de 2.7 µM. Os espermatozoides vivos (ou seja, YO-PRO negativos) foram classificados com alta e baixa fluidez – ou seja, alta concentração de M540 e baixa concentração de M540, respectivamente (Perry *et al.*, 2019).

#### *Funcionalidade de membrana plasmática*

A integridade de membrana (IM) foi avaliada utilizando 20 µM de diacetato de carboxifluoresceina (CFDA) e 7,5 µM de iodeto de propídeo (IP). O IP cora as células que possuem injúrias de membrana com fluorescência vermelha, enquanto o CFDA penetra o citoplasma de células com membranas integrais, onde fica retido, corando as células de verde. Ou seja, gametas marcados apenas com CFDA possuem membrana plasmática intacta (Perry *et al.*, 2019).

#### *Funcionalidade mitocondrial (MIT)*

Este parâmetro foi avaliado através da utilização do marcador Rodamina 123 (100 nM), combinado com IP (7,3 µM). Espermatozoides intactos foram selecionados e classificados com alta atividade mitocondrial ficaram intensamente coradas com fluorescência verde, devido a um alto acúmulo de rhodamine; células com marcação verde discreta, foram consideradas com baixa atividade mitocondrial (Silva *et al.*, 2016).

#### *Integridade acrossomal*

O acrossoma (ACRO) foi avaliado utilizando através da utilização da solução de lectina *Arachis hypoagea* e isotiocianato de fluoresceína (20µl – 20mg/mL) combinada com IP (20 µL). Espermatozoides intactos emitem fluorescência verde e possuem formato de meia-lua, enquanto um acrossoma danificado cora com fluorescência vermelha, apresentando também uma morfologia anormal (Martínez-Pastor *et al.*, 2010).

#### *Índice de fragmentação de DNA*

O índice de fragmentação de DNA (DFI) foi analisado pelo ensaio da estrutura da cromatina. As amostras foram expostas ao TNE (0.01 M Tris-HCl; 0.15 M NaCl; 0.001 M EDTA; pH 7,2 - Sigma, St. Louis, MO, USA), e após 30 segundos ao Triton (Triton® X – 1, 0,1%; Sigma, St. Louis, MO, USA). O marcador laranja de acridina (2 mg mL<sup>-1</sup>) foi adicionado nos momentos anteriores à análise da amostra, não excedendo dois minutos de exposição. Este corante irá se ligar aos ácidos nucleicos do DNA, ou seja, caso o DNA esteja desnaturado, irá emitir uma fluorescência vermelha; porém, quando a hélice de DNA fita dupla está devidamente condensado, o laranja acridina tem um acesso limitado ao DNA e, nesse caso, emite uma fluorescência verde (Perry *et al.*, 2019).

#### *Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio*

Marcadores de estresse oxidativo, carboxy-H2DCF-DA (1mM) e IP (7.5 µM), foram utilizados de forma a analisar a produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS). Foram realizadas duas análises: imediatamente após a adição de fluorocromos à amostra e novamente após incubação à 37°C por 60 min. O ROS foi determinado pela intensidade da fluorescência verde (indicador de oxidação) em espermatozoides viáveis. Os resultados foram expressos em taxa de ROS intracelular (Perry *et al.*, 2019).

#### *Peroxidação lipídica*

O nível de peroxidação lipídica (LPO) foi medido com o fluoróforo BODYPY (5 µM), que se integra às membranas e responde aos processos de peroxidação lipídica: vermelha quando existem pouca peroxidação, passando para verde conforme essa taxa aumenta. As amostras foram avaliadas após 120 min de incubação a

37°C. Os resultados foram expressos em percentual de espermatozoides com peroxidação lipídica (Zanin *et al.*, 2021).

#### *Análise estatística*

As análises estatísticas foram realizadas com o uso do *software* Statistix 10 (Analytical Software, 2014). O teste de Shapiro-Wilk foi empregado para verificação da normalidade dos dados. Após a realização do ANOVA, as médias foram comparadas, dentro dos períodos, pelo teste do Tukey. A significância foi atribuída a todas as médias com  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Devido ao grande conjunto de dados obtidos no experimento, os resultados secundários as principais inferências deste artigo estão sumarizadas da Tabela 5 a 21 em Dados Complementares.

#### *Cinética espermática*

Em D3 a MT e MP com o uso de 0,5mM do S75 obtiveram as maiores médias ( $p < 0,05$ ), como detalhado na Tabela 2 e 3. As demais comparações entre médias estão representadas da Tabela 5 a 15 em Dados Complementares. A menor concentração testada (0,5mM) dos lipossomas S45, S75 e SCAR foi eficiente para a preservação da MT, na avaliação em 4 dias de refrigeração, quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ), e adicionalmente, as médias foram superiores quando comparadas aos demais tratamentos ( $p < 0,05$ ). A MT nas concentrações de 5mM e 1mM do S45, S100 e SCAR, assim como as três concentrações testadas de S100 foram inferiores quando comparadas ao controle.

A superioridade da manutenção da cinética com o uso da menor concentração de S75 e SCAR foi observada na análise em D4 da MP ( $p < 0,05$ ). As concentrações de 0,5mM do S45 assim como 1mM do S75 e SCAR foram superiores ao controle em D4. Com relação às outras concentrações de todos os lipossomas obtiveram resultados estatisticamente iguais ao grupo controle ( $p < 0,05$ ), enquanto 5mM do S75 demonstrou o menor resultado de MP em D4 ( $p < 0,05$ ).

Em relação aos demais parâmetros de cinética espermática aos 4 dias de refrigeração, com a utilização de S75 as médias superiores ao controle foram: DAP e VAP com o uso de 0,5mM; o DSL e VSL com 0,5mM e 1mM e STR e LIN na concentração de 1mM ( $p < 0,05$ ). Em contraste, a concentração de 5mM do S75 obteve médias inferiores ao controle ( $p < 0,05$ ).

O SCAR no tratamento de 0,5mM obteve médias de VSL, STR, LIN superiores ao controle, assim como 1mM para o WOB ( $p < 0,05$ ). Os resultados de distância e velocidade, WOB, ALH e BCF foram inferiores com uso de 5mM de SCAR ( $p < 0,05$ ). Outros tratamentos com médias menores que o controle foram: 1mM de S45 no DAP, DCL, VAP, VCL, STR, WOB, ALH e BCF; S100 na concentração de 0,5mM teve desempenho inferior em DAP, DCL, VCL, STR, LIN, e WOB, e a concentração de 5mM em todos os parâmetros, exceto LIN, e para ALH e BCF todas as concentrações testadas do S100 ( $p < 0,05$ ).

Tabela 2. Médias ( $\pm$  D.P.M.) da motilidade espermática total do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

S45 (mM)			S75 (mM)			S100 (mM)			SCAR (mM)			CONT	
	5	1	0,5		5	1	0,5		5	1	0,5	0	
D1	76,86 $\pm$ 1,25 <sup>bcd</sup>	78,26 $\pm$ 0,82 <sup>bc</sup>	81,90 $\pm$ 1,18 <sup>a</sup>	79,92 $\pm$ 0,90 <sup>ab</sup>	78,01 $\pm$ 1,06 <sup>bc</sup>	76,19 $\pm$ 2,11 <sup>cd</sup>	74,08 $\pm$ 1,35 <sup>de</sup>	76,15 $\pm$ 1,01 <sup>cd</sup>	66,67 $\pm$ 1,49 <sup>f</sup>	73,81 $\pm$ 1,20 <sup>dc</sup>	71,56 $\pm$ 1,43 <sup>c</sup>	74,03 $\pm$ 1,10 <sup>de</sup>	79,54 $\pm$ 1,01 <sup>abc</sup>
D2	69,99 $\pm$ 1,75 <sup>a</sup>	71,44 $\pm$ 1,72 <sup>a</sup>	68,75 $\pm$ 1,41 <sup>ab</sup>	66,83 $\pm$ 1,43 <sup>abc</sup>	62,73 $\pm$ 1,91 <sup>cde</sup>	71,22 $\pm$ 1,54 <sup>a</sup>	60,76 $\pm$ 1,75 <sup>de</sup>	68,19 $\pm$ 1,20 <sup>ab</sup>	47,99 $\pm$ 2,64 <sup>f</sup>	62,04 $\pm$ 1,73 <sup>cde</sup>	58,01 $\pm$ 2,29 <sup>c</sup>	65,06 $\pm$ 1,70 <sup>bcd</sup>	70,65 $\pm$ 1,20 <sup>a</sup>
D3	45,63 $\pm$ 2,25 <sup>bcd</sup>	51,18 $\pm$ 1,68 <sup>b</sup>	51,35 $\pm$ 1,88 <sup>b</sup>	44,06 $\pm$ 1,83 <sup>cd</sup>	45,48 $\pm$ 1,88 <sup>bcd</sup>	57,70 $\pm$ 1,75 <sup>a</sup>	48,21 $\pm$ 2,00 <sup>bc</sup>	47,79 $\pm$ 2,13 <sup>bc</sup>	32,72 $\pm$ 3,07 <sup>e</sup>	41,11 $\pm$ 2,09 <sup>d</sup>	40,76 $\pm$ 2,01 <sup>d</sup>	45,96 $\pm$ 2,05 <sup>bcd</sup>	40,44 $\pm$ 2,32 <sup>d</sup>
D4	28,30 $\pm$ 1,88 <sup>bcd</sup>	24,23 $\pm$ 1,91 <sup>cd</sup>	39,10 $\pm$ 2,15 <sup>a</sup>	11,72 $\pm$ 1,35 <sup>e</sup>	30,06 $\pm$ 2,50 <sup>bc</sup>	40,21 $\pm$ 2,35 <sup>a</sup>	27,92 $\pm$ 2,11 <sup>bcd</sup>	26,11 $\pm$ 2,19 <sup>bcd</sup>	22,22 $\pm$ 2,81 <sup>d</sup>	27,29 $\pm$ 2,31 <sup>bcd</sup>	30,38 $\pm$ 2,15 <sup>b</sup>	37,63 $\pm$ 2,98 <sup>a</sup>	36,92 $\pm$ 1,93 <sup>a</sup>

CONT = Controle. Letras distintas (a-e) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 3. Médias ( $\pm$  D.P.M.) da motilidade progressiva do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

S45 (mM)			S75 (mM)			S100 (mM)			SCAR (mM)			Controle	
	5	1	0,5		5	1	0,5		5	1	0,5	0	
D1	67,33 $\pm$ 1,64 <sup>cdef</sup>	68,19 $\pm$ 0,65 <sup>bcd</sup>	74,75 $\pm$ 1,58 <sup>a</sup>	70,19 $\pm$ 1,24 <sup>bc</sup>	70,64 $\pm$ 1,27 <sup>bc</sup>	71,05 $\pm$ 2,28 <sup>abc</sup>	65,01 $\pm$ 1,54 <sup>ef</sup>	69,60 $\pm$ 1,14 <sup>bcd</sup>	56,61 $\pm$ 2,03 <sup>g</sup>	63,83 $\pm$ 1,43 <sup>f</sup>	64,28 $\pm$ 1,34 <sup>ef</sup>	65,91 $\pm$ 1,25 <sup>def</sup>	71,45 $\pm$ 1,17 <sup>ab</sup>
D2	56,42 $\pm$ 1,62 <sup>bc</sup>	60,03 $\pm$ 2,06 <sup>ab</sup>	57,84 $\pm$ 1,64 <sup>ab</sup>	56,14 $\pm$ 1,48 <sup>bc</sup>	49,34 $\pm$ 2,16 <sup>d</sup>	62,92 $\pm$ 1,74 <sup>a</sup>	48,57 $\pm$ 1,58 <sup>d</sup>	59,24 $\pm$ 1,05 <sup>ab</sup>	40,33 $\pm$ 2,94 <sup>e</sup>	50,11 $\pm$ 2,09 <sup>d</sup>	48,22 $\pm$ 2,25 <sup>d</sup>	52,25 $\pm$ 1,92 <sup>cd</sup>	57,70 $\pm$ 1,32 <sup>ab</sup>
D3	22,08 $\pm$ 1,88 <sup>f</sup>	35,78 $\pm$ 2,20 <sup>bc</sup>	40,25 $\pm$ 1,90 <sup>b</sup>	21,44 $\pm$ 1,46 <sup>f</sup>	32,84 $\pm$ 1,53 <sup>cd</sup>	47,02 $\pm$ 1,90 <sup>a</sup>	27,79 $\pm$ 1,99 <sup>de</sup>	33,78 $\pm$ 2,07 <sup>c</sup>	22,27 $\pm$ 2,44 <sup>f</sup>	20,39 $\pm$ 2,05 <sup>f</sup>	25,79 $\pm$ 2,07 <sup>ef</sup>	33,91 $\pm$ 2,07 <sup>c</sup>	22,11 $\pm$ 1,53 <sup>f</sup>
D4	6,91 $\pm$ 0,73 <sup>dc</sup>	4,81 $\pm$ 0,47 <sup>ef</sup>	22,64 $\pm$ 1,81 <sup>b</sup>	2,56 $\pm$ 0,45 <sup>f</sup>	13,94 $\pm$ 1,60 <sup>c</sup>	29,01 $\pm$ 2,29 <sup>a</sup>	9,55 $\pm$ 1,26 <sup>d</sup>	9,39 $\pm$ 1,04 <sup>d</sup>	13,92 $\pm$ 2,43 <sup>d</sup>	7,42 $\pm$ 0,86 <sup>de</sup>	14,64 $\pm$ 1,89 <sup>c</sup>	29,95 $\pm$ 2,49 <sup>a</sup>	7,11 $\pm$ 0,61 <sup>dc</sup>

Letras distintas (a-g) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 4. Médias ( $\pm$  D.P.M.) da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

LIPO S45 (mM)			LIPO S75 (mM)			LIPO S100 (mM)			LIPO SCAR (mM)			Controle	
	5	1	0,5		5	1	0,5		5	1	0,5	0	
D1	10934 <sup>a</sup> $\pm$ 4513,7 <sup>a</sup>	6398,9 <sup>a</sup> $\pm$ 1448,4 <sup>a</sup>	7152,8 <sup>a</sup> $\pm$ 1133,0 <sup>a</sup>	7272,3 <sup>a</sup> $\pm$ 34370 <sup>a</sup>	7093,1 <sup>a</sup> $\pm$ 2015,7 <sup>a</sup>	8620,6 <sup>a</sup> $\pm$ 2073,8 <sup>a</sup>	7722,4 <sup>a</sup> $\pm$ 2989,7 <sup>a</sup>	6872,8 <sup>a</sup> $\pm$ 2112,1 <sup>a</sup>	7462,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1818,4 <sup>a</sup>	7875,9 <sup>a</sup> $\pm$ 2240,2 <sup>a</sup>	8358,8 <sup>a</sup> $\pm$ 3131,6 <sup>a</sup>	7974,3 <sup>a</sup> $\pm$ 2092,4 <sup>a</sup>	9142,1 <sup>a</sup> $\pm$ 3666,7 <sup>a</sup>
D2	22979 <sup>a</sup> $\pm$ 9016,2 <sup>b</sup>	27298 <sup>a</sup> $\pm$ 12146 <sup>b</sup>	47410 <sup>a</sup> $\pm$ 22649 <sup>b</sup>	13807 <sup>a</sup> $\pm$ 3617,7 <sup>b</sup>	14571 <sup>a</sup> $\pm$ 4025,3 <sup>b</sup>	19780 <sup>a</sup> $\pm$ 6939,4 <sup>b</sup>	9816,6 <sup>a</sup> $\pm$ 2561,0 <sup>b</sup>	10767 <sup>a</sup> $\pm$ 2752,4 <sup>b</sup>	12488 <sup>a</sup> $\pm$ 3185,9 <sup>b</sup>	8064,6 <sup>a</sup> $\pm$ 2172,0 <sup>b</sup>	8702 <sup>a</sup> $\pm$ 2175,6 <sup>b</sup>	10745 <sup>a</sup> $\pm$ 2628,3 <sup>b</sup>	98887 <sup>a</sup> $\pm$ 52377 <sup>a</sup>
D3	16792 <sup>a</sup> $\pm$ 11411 <sup>ab</sup>	20216 <sup>a</sup> $\pm$ 14568 <sup>ab</sup>	41302 <sup>a</sup> $\pm$ 34525 <sup>ab</sup>	7222,3 <sup>a</sup> $\pm$ 13073 <sup>b</sup>	8912,4 <sup>a</sup> $\pm$ 3435,1 <sup>b</sup>	11318 <sup>a</sup> $\pm$ 5249,4 <sup>b</sup>	6005,8 <sup>a</sup> $\pm$ 1525,3 <sup>b</sup>	6723,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1895,8 <sup>b</sup>	6156,5 <sup>a</sup> $\pm$ 2096,8 <sup>b</sup>	5055,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1256,9 <sup>b</sup>	6796,1 <sup>a</sup> $\pm$ 1339,2 <sup>b</sup>	7239,5 <sup>a</sup> $\pm$ 1473,5 <sup>b</sup>	68937 <sup>a</sup> $\pm$ 62123 <sup>a</sup>
D4	13885 <sup>a</sup> $\pm$ 5817,1 <sup>b</sup>	17679 <sup>a</sup> $\pm$ 10974 <sup>b</sup>	31487 <sup>a</sup> $\pm$ 17899 <sup>ab</sup>	8768,9 <sup>a</sup> $\pm$ 2715,0 <sup>b</sup>	8997,9 <sup>a</sup> $\pm$ 3139,3 <sup>b</sup>	12603 <sup>a</sup> $\pm$ 4980,3 <sup>b</sup>	6372,3 <sup>a</sup> $\pm$ 1993,7 <sup>b</sup>	3811 <sup>a</sup> $\pm$ 1762,7 <sup>b</sup>	6623,9 <sup>a</sup> $\pm$ 2523,2 <sup>b</sup>	6376,7 <sup>a</sup> $\pm$ 1467,0 <sup>b</sup>	8143 <sup>a</sup> $\pm$ 2149,6 <sup>b</sup>	7772,9 <sup>a</sup> $\pm$ 2143,7 <sup>b</sup>	78107 <sup>a</sup> $\pm$ 59736 <sup>a</sup>

Letras distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

### *Parâmetros de integridade espermática*

Como sumarizado na Tabela 4 em D4 o uso dos lipossomas permitiu uma menor produção de espécies reativas de oxigênio intracelular (ROS) quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ), exceto no S45 com o uso de 0,5mM que não diferiu do controle. As comparações entre as médias para os demais parâmetros de integridade espermática estão detalhadas em Dados Complementares na Tabela 16 a 21. A avaliação no D4 evidenciou que os diferentes meios foram eficientes na manutenção, do nível de peroxidação lipídica, potencial de membrana mitocondrial e a fluidez de membrana espermática quando comparado ao controle ( $p < 0,05$ ), ainda, a integridade acrosomal foi preservada por até 4 dias de refrigeração ( $p > 0,05$ ). A fluidez de membrana foi menor nas avaliações em D2 e D3 com os lipossomas S75, S100 e SCAR, quando comparado ao controle (Tabela 18).

## **DISCUSSÃO**

Os resultados de cinética indicam que há um efeito aditivo na crioproteção do PL com o uso de 0,5Mol dos lipossomas S75 e SCAR, os mecanismos de ação dos lipossomas já relatados, demonstram a incorporação da fosfatidilcolina nos fosfolipídios nas membranas espermáticas, sendo que em perus aumentou a com fertilidade *in vivo* (Long; Conn, 2012). Adicionalmente as LIPO interagem com componentes do plasma seminal (BELALA *et al.*, 2016), como proteínas que levam a capacitação espermática.

Adicionalmente o uso dos LIPO testados apresentaram diminuição na produção de ROS, independente do uso do  $\beta$ -caroteno encapsulado, sugerindo um efeito antioxidante dos componentes da nanovesículas.

O ROS em espermatozoides criopreservados, é produzido pelo choque térmico e a interação da célula com oxigênio atmosférico, o aumento do ROS leva ao desequilíbrio entre radicais livres e os antioxidantes presentes no sêmen (Medeiros *et al.*, 2002). Devido ao alto teor de ácidos graxos poli-insaturados de membrana e poucas defesas antioxidantes, os espermatozoides são altamente sensíveis ao estresse oxidativo (Jones; Mann; Sherins, 1979; Gavella; Lipovac, 1992; Griveau; Le Lannou, 1997). Altas taxas de ROS, elevam a lipoperoxidação lipídica das membranas, inativam enzimas glicolíticas e levam os espermatozoides à capacitação, em níveis extremos à deterioração espermática (Alvarez; Storey, 1993; Leclerc; De Lamirande; Gagnon, 1997).

## **CONCLUSÕES**

O uso de lipossomas de fosfatidilcolina de soja e  $\beta$ -caroteno encapsulado diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular do sêmen canino refrigerado. O uso de 0,5mM do lipossoma S75 possibilitou as maiores médias de motilidade total e progressiva dos meios estudados neste experimento. Adicionalmente a mesma concentração de SCAR obteve motilidade progressiva, velocidade retilinearidade e linearidade superior ao meio controle.

## REFERÊNCIAS

- Alvarez, J. G., & Storey, B. T. (1993). Evidence that Membrane Stress Contributes More than Lipid Peroxidation to Sublethal Cryodamage in Cryopreserved Human Sperm: Glycerol and Other Polyols as Sole Cryoprotectant. *Andrology*, 14(3), 199–209. <https://doi.org/10.1002/j.1399-4640.1993.tb00383.x>
- Axnér, E., & Lagerson, E. (2016). Cryopreservation of Dog Semen in a Tris Extender with 1% or 2% Soya Bean Lecithin as a Replacement of Egg Yolk. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(2), 262–268. <https://doi.org/10.1111/rda.12675>
- Balbino, T. A., Aoki, N. T., Gasperini, A. A., Oliveira, C. L., Azzoni, A. R., Cavalcanti, L. P., & De La Torre, L. G. (2013b). Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. *Chemical Engineering Journal*, 226, 423–433. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.04.053>
- Beccaglia, M., Anastasi, P., & Luvoni, G. C. (2009). Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. *Veterinary Research Communications*, 33(S1), 77–80. <https://doi.org/10.1007/s11259-009-9249-9>
- Belala, R., Delay, J., Amirat, L., Ropers, M., Guillou, J. L., Anton, M., Schmitt, E., Thorin, C., Michaud, S., Kaidi, R., Tainturier, D., & Bencharif, D. (2016). The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4 °C. *Animal Reproduction Science*, 168, 100–109. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2016.02.032>
- Christiansen, I. J. (1986). Reproduction in the dog and cat. In *Bailliere Tindall eBooks*. <http://ci.nii.ac.jp/ncid/BA51857322>
- Corcini, C. D., Goularte, K. L., Bongalhardo, D. C., Lucia, T., Jardim, R. D., & Varela, A. S., Junior. (2015). Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. *Andrologia*, 48(1), 114–115. <https://doi.org/10.1111/and.12411>
- Dalmazzo, A., Losano, J. D. A., Rocha, C. C., Tsunoda, R. H., De Souza Ramos Angriman, D., Mendes, C. M., Assumpção, M. E. O. D., Nichi, M., & Barnabe, V. H. (2017). Effects of soy lecithin extender on dog sperm cryopreservation. *Animal Biotechnology*, 29(3), 174–182. <https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1334662>
- Rodrigues, T. V. D., Amore, T. D., Teixeira, E. C., & De Medeiros Burkert, J. F. (2019). Carotenoid Production by Rhodotorula mucilaginosa in Batch and Fed-Batch Fermentation Using Agroindustrial Byproducts. *Food Technology and Biotechnology*, 57(3), 388–398. <https://doi.org/10.17113/fb.57.03.19.6068>
- Gavella, M., & Lipovac, V. (1992). NADH-Dependent oxidoreductase (Diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Archives of Andrology*, 28(2), 135–141. <https://doi.org/10.3109/01485019208987691>
- Griveau, J. F., & Lannou, D. L. (1997). Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. *Andrology*, 20(2), 61–69. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2605.1997.00044.x>
- Hermansson, U., Johannisson, A., & Axnér, E. (2021). 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(3), 812–819. <https://doi.org/10.1002/vms3.445>
- Jones, R., Mann, T., & Sherins, R. (1979). Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertility and Sterility*, 31(5), 531–537. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)43999-3](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)43999-3)
- Kirti, K., Amita, S., Priti, S., Kumar, A. M., & Jyoti, S. (2014). Colorful world of microbes: Carotenoids and their applications. *Advances in Biology*, 2014, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2014/837891>
- Leclerc, P., De Lamirande, E., & Gagnon, C. (1997). Regulation of Protein-Tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. *Free Radical Biology and Medicine*, 22(4), 643–656. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00379-6](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00379-6)
- Long, J., & Conn, T. (2012). Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4°C for 24 hours. *Poultry Science*, 91(8), 1990–1996. <https://doi.org/10.3382/ps.2011-02028>
- Martinelli, C., Pucci, C., Battaglini, M., Marino, A., & Ciofani, G. (2020). Antioxidants and Nanotechnology: Promises and limits of potentially disruptive approaches in the treatment of central nervous system diseases. *Advanced Healthcare Materials*, 9(3). <https://doi.org/10.1002/adhm.201901589>
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., & De Paz, P. (2010). Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reproduction in Domestic Animals*, 45(s2), 67–78. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x>
- Medeiros, C., Forell, F., Oliveira, A., & Rodrigues, J. (2002). Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, 57(1), 327–344. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00674-4](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00674-4)
- Michelon, M., Mantovani, R. A., Sinigaglia-Coimbra, R., De La Torre, L. G., & Cunha, R. L. (2016). Structural characterization of β-carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. *Food Research International*, 79, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.11.020>
- Otero, D. M., Bulsing, B. A., Da M Huerta, K., Rosa, C. A., Zambiazi, R. C., Burkert, C. a. V., & De M Burkert, J. F. (2019). Carotenoid-producing yeasts in the brazilian biodiversity: isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 36(1), 117–129. <https://doi.org/10.1590/0104-6632.20190361s20170433>
- Perry, C. T., Corcini, C. D., Ancuti, A. N., Otte, M. V., Soares, S. L., Garcia, J. R. E., Muelbet, J. R. E., & Varela, A. S. (2019). Amides as cryoprotectants for the freezing of Brycon orbignyanus sperm. *Aquaculture*, 508, 90–97. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.03.015>

- Quinn, P. (1985). A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. *Cryobiology*, 22(2), 128–146. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(85\)90167-1](https://doi.org/10.1016/0011-2240(85)90167-1)
- Sánchez-Calabuig, M. J., Maillo, V., Beltrán-Breña, P., De La Fuente Martínez, J., Galera-Carrillo, S., Pérez-Gutiérrez, J. F., & Pérez-Cerezales, S. (2017). Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. *Reproductive Biology*, 17(3), 233–238. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2017.05.007>
- Silva, E. F., Varela, A. S., Cardoso, T. F., Stefanello, F. M., Kalb, A. C., Martínez, P. E., & Corcini, C. D. (2016). Reproductive toxicology of 2,4 dinitrophenol in boar sperm. *Toxicology in Vitro*, 35, 31–35. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.05.002>
- Zanin, M., Varela, A. S., Junior, Acosta, I. B., Gheller, S. M. M., Zimmermann, E., Froes, C. N., Gehrcke, M. I., & Corcini, C. D. (2020). Tricaine methanesulfonate (MS-222) on the spermatogenic quality of zebrafish, Danio rerio. *Aquaculture*, 533, 736090. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.736090>

### DADOS COMPLEMENTARES

Tabela 5. Médias ( $\pm$ D.P.M.) da distância média da trajetória (DAP) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

Lipossoma	S45			S75			S100			SCAR			Controle
mM	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	31,18 $\pm$ 0,57 <sup>abc</sup>	29,17 $\pm$ 0,39 <sup>d</sup>	32,29 $\pm$ 0,45 <sup>ab</sup>	30,23 $\pm$ 0,45 <sup>cd</sup>	30,93 $\pm$ 0,60 <sup>abc</sup>	30,63 $\pm$ 0,77 <sup>cd</sup>	30,38 $\pm$ 0,50 <sup>cd</sup>	31,42 $\pm$ 0,50 <sup>abc</sup>	30,83 $\pm$ 0,85 <sup>bc</sup>	30,29 $\pm$ 0,53 <sup>cd</sup>	29,93 $\pm$ 0,53 <sup>cd</sup>	30,71 $\pm$ 0,44 <sup>c</sup>	32,39 $\pm$ 0,46 <sup>a</sup>
D2	27,68 $\pm$ 0,57 <sup>bcd</sup>	27,98 $\pm$ 0,56 <sup>bcd</sup>	30,11 $\pm$ 0,48 <sup>a</sup>	27,39 $\pm$ 0,30 <sup>bcd</sup>	28,11 $\pm$ 0,72 <sup>bcd</sup>	29,97 $\pm$ 0,62 <sup>a</sup>	25,63 $\pm$ 0,73 <sup>f</sup>	28,60 $\pm$ 0,52 <sup>ab</sup>	26,15 $\pm$ 1,03 <sup>ef</sup>	26,49 $\pm$ 0,58 <sup>def</sup>	25,29 $\pm$ 0,60 <sup>f</sup>	28,45 $\pm$ 0,32 <sup>abc</sup>	26,77 $\pm$ 0,47 <sup>cdef</sup>
D3	20,55 $\pm$ 0,76 <sup>de</sup>	24,20 $\pm$ 0,76 <sup>b</sup>	29,06 $\pm$ 0,80 <sup>a</sup>	20,06 $\pm$ 0,71 <sup>e</sup>	23,23 $\pm$ 0,56 <sup>b</sup>	29,32 $\pm$ 0,50 <sup>a</sup>	20,76 $\pm$ 0,87 <sup>cde</sup>	24,08 $\pm$ 0,98 <sup>b</sup>	17,06 $\pm$ 1,05 <sup>f</sup>	22,49 $\pm$ 1,00 <sup>bcd</sup>	18,98 $\pm$ 1,05 <sup>ef</sup>	23,04 $\pm$ 0,91 <sup>bc</sup>	19,67 $\pm$ 0,91 <sup>e</sup>
D4	17,56 $\pm$ 1,08 <sup>cd</sup>	14,24 $\pm$ 1,16 <sup>ef</sup>	21,26 $\pm$ 1,02 <sup>ab</sup>	10,24 $\pm$ 1,22 <sup>g</sup>	20,81 $\pm$ 1,44 <sup>ab</sup>	22,15 $\pm$ 1,31 <sup>a</sup>	11,66 $\pm$ 0,95 <sup>fg</sup>	16,42 $\pm$ 1,07 <sup>de</sup>	13,70 $\pm$ 1,73 <sup>ef</sup>	13,93 $\pm$ 1,15 <sup>ef</sup>	18,51 $\pm$ 1,03 <sup>bcd</sup>	18,88 $\pm$ 1,27 <sup>abcd</sup>	18,34 $\pm$ 0,95 <sup>bcd</sup>

Letras distintas (a-g) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 6. Médias ( $\pm$ D.P.M.) da distância curvilínea do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

Lipossoma	S45			S75			S100			SCAR			Controle
mM	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	45,72 $\pm$ 0,76 <sup>bcd</sup>	42,70 $\pm$ 0,55 <sup>f</sup>	49,21 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	44,38 $\pm$ 0,74 <sup>cdef</sup>	43,54 $\pm$ 0,70 <sup>def</sup>	44,76 $\pm$ 1,20 <sup>cdef</sup>	44,23 $\pm$ 0,72 <sup>cdef</sup>	45,78 $\pm$ 0,79 <sup>bcd</sup>	46,08 $\pm$ 1,28 <sup>bc</sup>	46,07 $\pm$ 0,92 <sup>bc</sup>	43,39 $\pm$ 1,12 <sup>ef</sup>	46,52 $\pm$ 0,68 <sup>bc</sup>	47,68 $\pm$ 0,73 <sup>ab</sup>
D2	42,33 $\pm$ 1,10 <sup>b</sup>	41,17 $\pm$ 1,02 <sup>b</sup>	45,84 $\pm$ 0,86 <sup>a</sup>	40,13 $\pm$ 0,74 <sup>bc</sup>	42,22 $\pm$ 1,35 <sup>b</sup>	45,61 $\pm$ 0,98 <sup>a</sup>	37,31 $\pm$ 1,39 <sup>c</sup>	39,94 $\pm$ 0,82 <sup>bc</sup>	41,59 $\pm$ 1,77 <sup>b</sup>	39,54 $\pm$ 1,03 <sup>bc</sup>	37,72 $\pm$ 1,01 <sup>c</sup>	41,68 $\pm$ 0,64 <sup>b</sup>	39,66 $\pm$ 0,73 <sup>bc</sup>
D3	33,46 $\pm$ 1,37 <sup>bcd</sup>	37,37 $\pm$ 1,64 <sup>b</sup>	43,59 $\pm$ 1,42 <sup>a</sup>	30,95 $\pm$ 1,21 <sup>def</sup>	34,13 $\pm$ 1,13 <sup>bcd</sup>	44,80 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>	32,94 $\pm$ 1,46 <sup>cde</sup>	36,30 $\pm$ 1,87 <sup>bc</sup>	28,65 $\pm$ 1,82 <sup>f</sup>	36,10 $\pm$ 1,62 <sup>bc</sup>	27,87 $\pm$ 1,71 <sup>f</sup>	34,21 $\pm$ 1,57 <sup>bcd</sup>	29,90 $\pm$ 1,60 <sup>cf</sup>
D4	30,27 $\pm$ 1,89 <sup>abc</sup>	22,96 $\pm$ 1,94 <sup>def</sup>	33,58 $\pm$ 1,60 <sup>ab</sup>	16,34 $\pm$ 1,98 <sup>g</sup>	33,91 $\pm$ 2,93 <sup>ab</sup>	33,97 $\pm$ 2,17 <sup>a</sup>	17,76 $\pm$ 1,52 <sup>fg</sup>	26,74 $\pm$ 1,80 <sup>cde</sup>	22,19 $\pm$ 2,81 <sup>ef</sup>	22,28 $\pm$ 1,86 <sup>ef</sup>	28,05 $\pm$ 2,03 <sup>bcd</sup>	28,64 $\pm$ 2,15 <sup>abcd</sup>	29,89 $\pm$ 1,71 <sup>abc</sup>

Letras distintas (a-f) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 7. Médias ( $\pm$ D.P.M.) da distância linear progressiva (DSL) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

Lipossoma	S45			S75			S100			SCAR			Controle
mM	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	23,26 $\pm$ 0,69 <sup>ab</sup>	21,47 $\pm$ 0,46 <sup>cde</sup>	21,08 $\pm$ 0,54 <sup>dc</sup>	22,17 $\pm$ 0,53 <sup>bcd</sup>	23,82 $\pm$ 0,71 <sup>a</sup>	22,72 $\pm$ 0,65 <sup>abcd</sup>	22,62 $\pm$ 21,15 <sup>abcd</sup>	22,84 $\pm$ 0,55 <sup>abc</sup>	20,99 $\pm$ 0,95 <sup>e</sup>	20,99 $\pm$ 0,49 <sup>e</sup>	21,96 $\pm$ 0,34 <sup>bcd</sup>	21,15 $\pm$ 0,41 <sup>de</sup>	24,17 $\pm$ 0,53 <sup>a</sup>
D2	20,16 $\pm$ 0,48 <sup>abcd</sup>	20,79 $\pm$ 0,52 <sup>ab</sup>	18,33 $\pm$ 0,46 <sup>ef</sup>	20,22 $\pm$ 0,34 <sup>abcd</sup>	20,58 $\pm$ 0,57 <sup>abc</sup>	20,75 $\pm$ 0,42 <sup>ab</sup>	19,29 $\pm$ 0,50 <sup>cde</sup>	21,43 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	17,67 $\pm$ 0,87 <sup>f</sup>	19,16 $\pm$ 0,40 <sup>de</sup>	17,73 $\pm$ 0,44 <sup>f</sup>	19,52 $\pm$ 0,39 <sup>bcd</sup>	18,98 $\pm$ 0,40 <sup>def</sup>
D3	13,65 $\pm$ 0,58 <sup>e</sup>	17,18 $\pm$ 0,64 <sup>bc</sup>	18,21 $\pm$ 0,54 <sup>b</sup>	14,22 $\pm$ 0,53 <sup>de</sup>	17,16 $\pm$ 0,38 <sup>bc</sup>	20,54 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	14,43 $\pm$ 0,64 <sup>dc</sup>	16,95 $\pm$ 0,67 <sup>bc</sup>	11,55 $\pm$ 0,68 <sup>f</sup>	15,90 $\pm$ 0,74 <sup>cd</sup>	13,24 $\pm$ 0,81 <sup>ef</sup>	16,55 $\pm$ 0,68 <sup>bc</sup>	13,52 $\pm$ 0,67 <sup>e</sup>
D4	11,31 $\pm$ 0,77 <sup>e</sup>	8,95 $\pm$ 0,83 <sup>def</sup>	12,25 $\pm$ 0,59 <sup>bc</sup>	6,89 $\pm$ 0,88 <sup>f</sup>	14,46 $\pm$ 1,09 <sup>ab</sup>	14,52 $\pm$ 1,83 <sup>a</sup>	8,17 $\pm$ 0,70 <sup>f</sup>	10,62 $\pm$ 0,71 <sup>cde</sup>	8,68 $\pm$ 1,06 <sup>def</sup>	8,33 $\pm$ 0,73 <sup>ef</sup>	12,65 $\pm$ 0,87 <sup>abc</sup>	13,78 $\pm$ 0,91 <sup>ab</sup>	10,80 $\pm$ 0,73 <sup>cd</sup>

Letras distintas (a-f) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 8 Médias ( $\pm$ D.P.M.) da velocidade média da trajetória (VAP) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

Lipossoma	S45			S75			S100			SCAR			Controle
mM	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	68,19 $\pm$ 1,19 <sup>ab</sup>	63,83 $\pm$ 0,81 <sup>d</sup>	70,57 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	65,75 $\pm$ 0,92 <sup>bcd</sup>	67,50 $\pm$ 1,32 <sup>abc</sup>	66,21 $\pm$ 1,67 <sup>bcd</sup>	65,97 $\pm$ 1,04 <sup>bcd</sup>	67,98 $\pm$ 1,03 <sup>ab</sup>	66,				

Tabela 10. Médias(±D.P.M.) velocidade linear progressiva (VSL) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

Lipossoma	S45			S75			S100			SCAR			Controle
mM	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	50,84±1,48 <sup>ab</sup>	46,96±0,97 <sup>cde</sup>	46,06±1,13 <sup>cde</sup>	48,16±1,11 <sup>bcd</sup>	52,02±1,60 <sup>a</sup>	49,10±1,42 <sup>abcd</sup>	49,07±1,17 <sup>abcd</sup>	49,40±1,15 <sup>abc</sup>	45,26±2,03 <sup>e</sup>	45,49±1,01 <sup>c</sup>	47,46±0,70 <sup>bcd</sup>	45,90±0,84 <sup>dc</sup>	52,40±1,12 <sup>a</sup>
D2	43,58±1,06 <sup>abcd</sup>	44,87±1,09 <sup>ab</sup>	39,50±0,91 <sup>ef</sup>	43,64±0,69 <sup>abcd</sup>	44,37±1,24 <sup>abc</sup>	44,65±0,89 <sup>ab</sup>	41,20±1,06 <sup>de</sup>	45,90±1,07 <sup>a</sup>	37,91±1,87 <sup>f</sup>	41,38±0,92 <sup>cde</sup>	38,05±0,94 <sup>f</sup>	42,16±0,79 <sup>bcd</sup>	41,11±0,91 <sup>de</sup>
D3	29,01±1,22 <sup>e</sup>	36,61±1,37 <sup>bc</sup>	38,71±1,14 <sup>b</sup>	30,22±1,12 <sup>e</sup>	36,19±0,79 <sup>bc</sup>	44,46±0,80 <sup>a</sup>	30,82±1,36 <sup>de</sup>	36,42±1,42 <sup>bc</sup>	24,66±1,45 <sup>f</sup>	34,06±1,57 <sup>bd</sup>	27,98±1,72 <sup>ef</sup>	35,07±1,42 <sup>bc</sup>	28,68±1,44 <sup>e</sup>
D4	24,18±1,62 <sup>e</sup>	19,16±1,73 <sup>def</sup>	26,00±1,25 <sup>bc</sup>	14,75±1,85 <sup>f</sup>	30,57±2,27 <sup>ab</sup>	31,03±1,74 <sup>a</sup>	17,50±1,49 <sup>f</sup>	22,45±1,50 <sup>cde</sup>	18,95±2,24 <sup>def</sup>	18,09±1,52 <sup>ef</sup>	27,08±1,82 <sup>abc</sup>	29,41±1,93 <sup>ab</sup>	23,25±1,53 <sup>cd</sup>

Letras distintas (a-f) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 11. Médias (±D.P.M.) de retilinearidade (STR) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

Lipossoma	S45			S75			S100			SCAR			Controle
mM	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	0,73±0,009 <sup>b</sup>	0,73±0,006 <sup>b</sup>	0,66±0,01 <sup>d</sup>	0,72±0,008 <sup>b</sup>	0,75±0,009 <sup>a</sup>	0,74±0,007 <sup>ab</sup>	0,73±0,007 <sup>ab</sup>	0,72±0,007 <sup>b</sup>	0,66±0,01 <sup>d</sup>	0,68±0,007 <sup>c</sup>	0,74±0,008 <sup>ab</sup>	0,68±0,007 <sup>c</sup>	0,73±0,007 <sup>ab</sup>
D2	0,72±0,007 <sup>bc</sup>	0,74±0,007 <sup>ab</sup>	0,60±0,009 <sup>h</sup>	0,73±0,008 <sup>b</sup>	0,73±0,007 <sup>bc</sup>	0,69±0,006 <sup>f</sup>	0,76±0,008 <sup>a</sup>	0,74±0,009 <sup>ab</sup>	0,65±0,01 <sup>g</sup>	0,72±0,005 <sup>bcd</sup>	0,70±0,008 <sup>def</sup>	0,68±0,01 <sup>f</sup>	0,71±0,006 <sup>cde</sup>
D3	0,61±0,02 <sup>fg</sup>	0,69±0,01 <sup>abc</sup>	0,63±0,01 <sup>cdef</sup>	0,67±0,02 <sup>bcd</sup>	0,74±0,009 <sup>a</sup>	0,70±0,01 <sup>ab</sup>	0,63±0,02 <sup>cdef</sup>	0,69±0,01 <sup>ab</sup>	0,56±0,03 <sup>g</sup>	0,66±0,01 <sup>bcd</sup>	0,58±0,02 <sup>fg</sup>	0,66±2,02 <sup>bcd</sup>	0,62±0,02 <sup>cdef</sup>
D4	0,53±0,02 <sup>bc</sup>	0,44±0,03 <sup>de</sup>	0,50±0,02 <sup>bcd</sup>	0,34±0,03 <sup>f</sup>	0,64±0,02 <sup>a</sup>	0,56±0,02 <sup>ab</sup>	0,46±0,03 <sup>cd</sup>	0,52±0,02 <sup>bcd</sup>	0,36±0,04 <sup>f</sup>	0,46±0,03 <sup>cd</sup>	0,63±0,02 <sup>a</sup>	0,65±0,03 <sup>a</sup>	0,53±0,02 <sup>bc</sup>

Letras distintas (a-g) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 12. Médias (±D.P.M.) da linearidade (LIN) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

Lipossoma	S45			6 - S75			S100			SCAR			Controle
mM	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	0,50±0,009 <sup>c</sup>	0,50±0,007 <sup>c</sup>	0,43±0,008 <sup>e</sup>	0,49±0,007 <sup>c</sup>	0,54±0,01 <sup>a</sup>	0,51±0,007 <sup>bc</sup>	0,50±0,006 <sup>bc</sup>	0,49±0,007 <sup>c</sup>	0,44±0,01 <sup>dc</sup>	0,45±0,005 <sup>d</sup>	0,53±0,01 <sup>ab</sup>	0,45±0,006 <sup>d</sup>	0,50±0,007 <sup>c</sup>
D2	0,48±0,007 <sup>def</sup>	0,51±0,01 <sup>cd</sup>	0,39±0,005 <sup>g</sup>	0,51±0,01 <sup>bc</sup>	0,50±0,008 <sup>cde</sup>	0,45±0,005 <sup>f</sup>	0,55±0,01 <sup>a</sup>	0,54±0,01 <sup>ab</sup>	0,42±0,01 <sup>g</sup>	0,49±0,006 <sup>cde</sup>	0,48±0,009 <sup>ef</sup>	0,48±0,01 <sup>ef</sup>	0,48±0,009 <sup>def</sup>
D3	0,38±0,01 <sup>fg</sup>	0,47±0,01 <sup>bc</sup>	0,43±0,01 <sup>cde</sup>	0,44±0,01 <sup>bcd</sup>	0,53±0,01 <sup>a</sup>	0,48±0,01 <sup>bc</sup>	0,40±0,01 <sup>ef</sup>	0,48±0,01 <sup>b</sup>	0,35±0,02 <sup>g</sup>	0,42±0,01 <sup>def</sup>	0,42±0,02 <sup>def</sup>	0,46±0,01 <sup>bcd</sup>	0,43±0,02 <sup>cde</sup>
D4	0,32±0,01 <sup>d</sup>	0,28±0,02 <sup>de</sup>	0,32±0,01 <sup>d</sup>	0,22±0,02 <sup>f</sup>	0,44±0,02 <sup>ab</sup>	0,38±0,01 <sup>bc</sup>	0,32±0,02 <sup>d</sup>	0,32±0,01 <sup>cd</sup>	0,23±0,02 <sup>ef</sup>	0,30±0,02 <sup>de</sup>	0,46±0,02 <sup>a</sup>	0,44±0,02 <sup>ab</sup>	0,33±0,02 <sup>cd</sup>

Letras distintas (a-g) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 13. Médias(±D.P.M.) dos valores de coeficiente de oscilação (WOB) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

Lipossoma	S45			S75			S100			SCAR			Controle
mM	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	0,68±0,004 <sup>bc</sup>	0,68±0,004 <sup>bc</sup>	0,66±0,004 <sup>e</sup>	0,68±0,003 <sup>bc</sup>	0,70±0,006 <sup>a</sup>	0,68±0,004 <sup>b</sup>	0,68±0,003 <sup>b</sup>	0,68±0,003 <sup>b</sup>	0,67±0,006 <sup>cd</sup>	0,66±0,003 <sup>dc</sup>	0,70±0,009 <sup>a</sup>	0,66±0,004 <sup>dc</sup>	0,68±0,004 <sup>bc</sup>
D2	0,66±0,006 <sup>d</sup>	0,69±0,007 <sup>c</sup>	0,65±0,004 <sup>de</sup>	0,69±0,01 <sup>bc</sup>	0,68±0,006 <sup>cd</sup>	0,65±0,004 <sup>de</sup>	0,71±0,01 <sup>ab</sup>	0,72±0,01 <sup>a</sup>	0,63±0,01 <sup>e</sup>	0,67±0,004 <sup>cd</sup>	0,67±0,006 <sup>cd</sup>	0,69±0,01 <sup>bc</sup>	0,68±0,006 <sup>cd</sup>
D3	0,58±0,01 <sup>e</sup>	0,67±0,01 <sup>abc</sup>	0,68±0,009 <sup>ab</sup>	0,62±0,01 <sup>cde</sup>	0,70±0,01 <sup>a</sup>	0,66±0,009 <sup>abc</sup>	0,58±0,01 <sup>e</sup>	0,68±0,01 <sup>ab</sup>	0,50±0,02 <sup>f</sup>	0,59±0,01 <sup>de</sup>	0,60±0,02 <sup>de</sup>	0,63±0,02 <sup>bcd</sup>	0,62±0,02 <sup>cde</sup>
D4	0,50±0,02 <sup>de</sup>	0,45±0,03 <sup>e</sup>	0,55±0,02 <sup>bcd</sup>	0,33±0,03 <sup>f</sup>	0,62±0,02 <sup>ab</sup>	0,57±0,02 <sup>bcd</sup>	0,45±0,03 <sup>e</sup>	0,51±0,02 <sup>cde</sup>	0,34±0,03 <sup>f</sup>	0,48±0,03 <sup>de</sup>	0,66±0,02 <sup>a</sup>	0,59±0,02 <sup>ab</sup>	0,58±0,02 <sup>bc</sup>

Letras distintas (a-f) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 14. Médias (±D.P.M.) dos valores de amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

<tbl\_header

Tabela 15. Médias ( $\pm$ D.P.M.) da frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas.

Lipossoma	S45			S75			S100			SCAR			Controle
mM	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	29,38 $\pm$ 0,32 <sup>abc</sup>	30,11 $\pm$ 0,25 <sup>a</sup>	27,23 $\pm$ 0,25 <sup>c</sup>	29,16 $\pm$ 0,28 <sup>bc</sup>	30,21 $\pm$ 0,32 <sup>a</sup>	28,62 $\pm$ 0,35 <sup>cd</sup>	29,71 $\pm$ 0,28 <sup>ab</sup>	28,86 $\pm$ 0,33 <sup>cd</sup>	27,26 $\pm$ 0,35 <sup>c</sup>	28,73 $\pm$ 0,35 <sup>cd</sup>	29,11 $\pm$ 0,39 <sup>bcd</sup>	28,31 $\pm$ 0,22 <sup>d</sup>	30,12 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>
D2	30,55 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	30,69 $\pm$ 0,39 <sup>a</sup>	25,74 $\pm$ 0,31 <sup>c</sup>	29,71 $\pm$ 0,32 <sup>abc</sup>	30,11 $\pm$ 0,36 <sup>ab</sup>	29,06 $\pm$ 0,30 <sup>bcd</sup>	29,43 $\pm$ 0,35 <sup>bcd</sup>	29,90 $\pm$ 0,28 <sup>ab</sup>	26,64 $\pm$ 0,61 <sup>c</sup>	29,66 $\pm$ 0,30 <sup>abc</sup>	28,43 $\pm$ 0,54 <sup>d</sup>	28,81 $\pm$ 0,36 <sup>cd</sup>	29,12 $\pm$ 0,34 <sup>bcd</sup>
D3	26,37 $\pm$ 0,08 <sup>cde</sup>	28,70 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	25,90 $\pm$ 0,44 <sup>de</sup>	26,74 $\pm$ 0,78 <sup>bcd</sup>	28,21 $\pm$ 0,41 <sup>abc</sup>	29,17 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	26,59 $\pm$ 0,92 <sup>bcd</sup>	27,31 $\pm$ 0,58 <sup>abcd</sup>	22,38 $\pm$ 0,122 <sup>g</sup>	26,25 $\pm$ 0,87 <sup>cde</sup>	23,20 $\pm$ 1,13 <sup>fg</sup>	26,21 $\pm$ 0,99 <sup>de</sup>	24,81 $\pm$ 0,99 <sup>ef</sup>
D4	23,64 $\pm$ 1,24 <sup>abc</sup>	19,34 $\pm$ 1,38 <sup>dc</sup>	23,49 $\pm$ 1,01 <sup>abc</sup>	13,05 $\pm$ 1,45 <sup>g</sup>	23,27 $\pm$ 1,05 <sup>abc</sup>	22,07 $\pm$ 1,09 <sup>cd</sup>	17,62 $\pm$ 1,44 <sup>ef</sup>	22,64 $\pm$ 1,28 <sup>bcd</sup>	14,78 $\pm$ 1,62 <sup>fg</sup>	20,04 $\pm$ 1,52 <sup>cde</sup>	26,01 $\pm$ 0,98 <sup>ab</sup>	23,84 $\pm$ 1,41 <sup>abc</sup>	26,65 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>

Letras distintas (a-g) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 16. Médias ( $\pm$ D.P.M.) dos níveis de peroxidação lipídica (LPO) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).

	LIPO S45 (mM)			LIPO S75 (mM)			LIPO S100 (mM)			LIPO SCAR (mM)			Controle
	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	14,08 $\pm$ 3,08 <sup>a</sup>	14,26 $\pm$ 3,77 <sup>a</sup>	15,28 $\pm$ 3,56 <sup>a</sup>	14,76 $\pm$ 3,07 <sup>a</sup>	13,12 $\pm$ 2,35 <sup>a</sup>	13,01 $\pm$ 3,33 <sup>a</sup>	11,33 $\pm$ 11,32 <sup>a</sup>	10,78 $\pm$ 2,55 <sup>a</sup>	14,49 $\pm$ 2,52 <sup>a</sup>	8,56 $\pm$ 3,03 <sup>a</sup>	12,76 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	11,80 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	13,92 $\pm$ 3,58 <sup>a</sup>
D2	23,60 $\pm$ 2,67 <sup>a</sup>	22,21 $\pm$ 2,54 <sup>ab</sup>	18,75 $\pm$ 2,93 <sup>ab</sup>	16,35 $\pm$ 2,33 <sup>ab</sup>	19,88 $\pm$ 2,29 <sup>ab</sup>	21,09 $\pm$ 2,57 <sup>ab</sup>	19,31 $\pm$ 2,29 <sup>ab</sup>	16,87 $\pm$ 3,00 <sup>ab</sup>	21,32 $\pm$ 2,77 <sup>ab</sup>	19,64 $\pm$ 2,25 <sup>ab</sup>	19,45 $\pm$ 2,11 <sup>ab</sup>	15,27 $\pm$ 2,28 <sup>b</sup>	21,17 $\pm$ 3,35 <sup>ab</sup>
D3	12,74 $\pm$ 3,84 <sup>a</sup>	10,51 $\pm$ 2,45 <sup>a</sup>	13,50 $\pm$ 3,89 <sup>a</sup>	14,96 $\pm$ 4,36 <sup>a</sup>	12,85 $\pm$ 2,82 <sup>a</sup>	12,05 $\pm$ 3,88 <sup>a</sup>	11,82 $\pm$ 3,07 <sup>a</sup>	11,91 $\pm$ 3,21 <sup>a</sup>	11,91 $\pm$ 3,75 <sup>a</sup>	9,77 $\pm$ 1,83 <sup>a</sup>	12,60 $\pm$ 3,15 <sup>a</sup>	10,81 $\pm$ 2,12 <sup>a</sup>	14,35 $\pm$ 3,81 <sup>a</sup>
D4	7,94 $\pm$ 3,21 <sup>a</sup>	5,00 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	7,20 $\pm$ 2,30 <sup>a</sup>	3,86 $\pm$ 1,49 <sup>a</sup>	6,86 $\pm$ 2,74 <sup>a</sup>	6,36 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>	6,37 $\pm$ 1,85 <sup>a</sup>	8,65 $\pm$ 2,83 <sup>a</sup>	6,15 $\pm$ 1,60 <sup>a</sup>	6,31 $\pm$ 1,53 <sup>a</sup>	8,12 $\pm$ 2,44 <sup>a</sup>	8,89 $\pm$ 3,70 <sup>a</sup>	9,25 $\pm$ 2,77 <sup>a</sup>

Letras distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 17. Médias ( $\pm$ D.P.M.) de reação acrossomal (ACRO) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).

	LIPO 5 S45 (mM)			LIPO 6 S75 (mM)			LIPO 7 S100 (mM)			LIPO SCAR (mM)			Controle
	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	72,71 $\pm$ 13,49	80,99 $\pm$ 10,78	78,95 $\pm$ 11,24	75,54 $\pm$ 13,60	76,82 $\pm$ 11,47	77,6 $\pm$ 11,48	73,89 $\pm$ 13,41	82,14 $\pm$ 10,80	81,77 $\pm$ 7,35	86,54 $\pm$ 10,73	80,04 $\pm$ 10,41	76,65 $\pm$ 12,14	55,68 $\pm$ 11,21
D2	66,31 $\pm$ 12,10	63,44 $\pm$ 10,67	62,60 $\pm$ 12,28	71,28 $\pm$ 9,49	70,32 $\pm$ 9,89	62,86 $\pm$ 10,22	67,63 $\pm$ 10,99	71,00 $\pm$ 10,49	59,29 $\pm$ 11,08	70,51 $\pm$ 8,75	57,25 $\pm$ 13,02	61,01 $\pm$ 11,19	62,85 $\pm$ 12,75
D3	62,73 $\pm$ 15,06	61,42 $\pm$ 15,06	60,51 $\pm$ 15,19	62,55 $\pm$ 15,50	58,56 $\pm$ 14,73	59,92 $\pm$ 15,52	58,02 $\pm$ 14,19	61,12 $\pm$ 14,88	11,91 $\pm$ 14,60	85,02 $\pm$ 5,96	71,05 $\pm$ 10,85	82,2 $\pm$ 7,97	57,55 $\pm$ 14,94
D4	55,84 $\pm$ 11,90	51,58 $\pm$ 14,75	59,99 $\pm$ 15,02	60,42 $\pm$ 14,94	53,59 $\pm$ 14,13	51,53 $\pm$ 13,10	69,6 $\pm$ 11,72	56,68 $\pm$ 15,92	62,85 $\pm$ 13,11	60 $\pm$ 14,82	63,18 $\pm$ 12,41	49,06 $\pm$ 14,23	40,97 $\pm$ 13,40

As médias não diferiram entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p > 0,05$ ).

Tabela 18. Médias ( $\pm$ D.P.M.) da fluidez de membrana (FLU) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).

	LIPO 5 S45 (mM)			LIPO 6 S75 (mM)			LIPO 7 S100 (mM)			LIPO SCAR (mM)			Controle
	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	4118,9 $\pm$ 1212,2 <sup>b</sup>	5358,9 $\pm$ 851204 <sup>b</sup>	16231 $\pm$ 61069 <sup>a</sup>	4560,6 $\pm$ 6621,3 <sup>b</sup>	14000 $\pm$ 605,77 <sup>ab</sup>	4434,4 $\pm$ 595,65 <sup>b</sup>	5487,5 $\pm$ 564,06 <sup>b</sup>	4572,4 $\pm$ 767,96 <sup>b</sup>	4711,6 $\pm$ 844,96 <sup>b</sup>	8842,4 $\pm$ 5191,9 <sup>ab</sup>	4586,5 $\pm$ 660,72 <sup>b</sup>	4096,8 $\pm$ 1223,6 <sup>b</sup>	16231 $\pm$ 6106,9 <sup>a</sup>
D2	17832 $\pm$ 12859 <sup>ab</sup>	20867 $\pm$ 14961 <sup>ab</sup>	32822										

Tabela 20. Médias ( $\pm$ D.P.M.) da funcionalidade mitocondrial (MIT) do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).

	LIPO S45 (mM)			LIPO S75 (mM)			LIPO 100 (mM)			LIPO SCAR (mM)			Controle
	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	125273 $\pm$ 37800 <sup>a</sup>	128060 $\pm$ 26820 <sup>a</sup>	121309 $\pm$ 33323 <sup>a</sup>	82509 $\pm$ 35170 <sup>a</sup>	78357 $\pm$ 27848 <sup>a</sup>	124329 $\pm$ 38370 <sup>a</sup>	85161 $\pm$ 23494 <sup>a</sup>	90760 $\pm$ 266958 <sup>a</sup>	88858 $\pm$ 22199 <sup>a</sup>	87719 $\pm$ 21274 <sup>a</sup>	117558 $\pm$ 30883 <sup>a</sup>	95388 $\pm$ 25197 <sup>a</sup>	87243 $\pm$ 24863 <sup>a</sup>
D2	60165 $\pm$ 8145 <sup>ab</sup>	71225 $\pm$ 11117 <sup>ab</sup>	106880 $\pm$ 31173 <sup>ab</sup>	53274 $\pm$ 64333 <sup>ab</sup>	62249 $\pm$ 4072 <sup>ab</sup>	71092 $\pm$ 6689,8 <sup>ab</sup>	51500 $\pm$ 6922,4 <sup>ab</sup>	65502 $\pm$ 6528,7 <sup>ab</sup>	71814 $\pm$ 9862,5 <sup>ab</sup>	49478 $\pm$ 7094,6 <sup>b</sup>	49513 $\pm$ 9015 <sup>ab</sup>	59466 $\pm$ 9827,4 <sup>ab</sup>	109031 $\pm$ 64399 <sup>a</sup>
D3	71068 $\pm$ 10289 <sup>ab</sup>	80370 $\pm$ 9977,7 <sup>ab</sup>	101048 $\pm$ 24160 <sup>ab</sup>	75754 $\pm$ 13073 <sup>ab</sup>	72803 $\pm$ 9228,3 <sup>ab</sup>	90109 $\pm$ 10395 <sup>ab</sup>	60360 $\pm$ 8489,9 <sup>b</sup>	60119 $\pm$ 7806 <sup>b</sup>	83438 $\pm$ 15593 <sup>ab</sup>	66209 $\pm$ 8631,6 <sup>b</sup>	85051 $\pm$ 16397 <sup>ab</sup>	69207 $\pm$ 13676 <sup>ab</sup>	114556 $\pm$ 36846 <sup>a</sup>
D4	63844 $\pm$ 16763 <sup>a</sup>	57312 $\pm$ 21623 <sup>a</sup>	133128 $\pm$ 28740 <sup>a</sup>	39670 $\pm$ 9192,5 <sup>a</sup>	41006 $\pm$ 7980,2 <sup>a</sup>	73732 $\pm$ 21163 <sup>a</sup>	43708 $\pm$ 4256,7 <sup>a</sup>	52722 $\pm$ 13194 <sup>a</sup>	64943 $\pm$ 13500 <sup>a</sup>	70006 $\pm$ 16257 <sup>a</sup>	59076 $\pm$ 15575 <sup>a</sup>	57113 $\pm$ 14711 <sup>a</sup>	149106 $\pm$ 82219 <sup>a</sup>

Letras distintas (a-b) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

Tabela 21. Médias ( $\pm$ D.P.M.) ruptura celular do sêmen canino refrigerado nos diferentes meios contendo os lipossomas (LIPO).

	LIPO S45 (mM)			LIPO S75 (mM)			LIPO S100 (mM)			LIPO SCAR (mM)			Controle
	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	5	1	0,5	0
D1	12,23 $\pm$ 1,98 <sup>b</sup>	14,12 $\pm$ 4,47 <sup>b</sup>	10,29 $\pm$ 1,60 <sup>b</sup>	16,43 $\pm$ 5,04 <sup>ab</sup>	12,45 $\pm$ 1,75 <sup>b</sup>	11,81 $\pm$ 1,91 <sup>b</sup>	13,14 $\pm$ 2,55 <sup>b</sup>	12,78 $\pm$ 1,99 <sup>b</sup>	15,04 $\pm$ 2,99 <sup>b</sup>	12,33 $\pm$ 2,59 <sup>b</sup>	11,39 $\pm$ 1,39 <sup>b</sup>	11,67 $\pm$ 0,90 <sup>b</sup>	25,76 $\pm$ 7,95 <sup>a</sup>
D2	12,70 $\pm$ 1,37 <sup>a</sup>	12,24 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	16,09 $\pm$ 3,11 <sup>a</sup>	14,76 $\pm$ 1,68 <sup>a</sup>	14,47 $\pm$ 2,20 <sup>a</sup>	15,03 $\pm$ 1,43 <sup>a</sup>	16,72 $\pm$ 3,01 <sup>a</sup>	12,53 $\pm$ 1,21 <sup>a</sup>	16,85 $\pm$ 2,34 <sup>a</sup>	13,51 $\pm$ 2,10 <sup>a</sup>	11,87 $\pm$ 2,11 <sup>a</sup>	14,08 $\pm$ 1,97 <sup>a</sup>	13,28 $\pm$ 2,70 <sup>a</sup>
D3	15,73 $\pm$ 2,84 <sup>b</sup>	14,81 $\pm$ 1,81 <sup>b</sup>	13,88 $\pm$ 1,84 <sup>b</sup>	16,05 $\pm$ 1,75 <sup>b</sup>	14,46 $\pm$ 1,43 <sup>b</sup>	18,56 $\pm$ 3,07 <sup>ab</sup>	15,93 $\pm$ 1,82 <sup>b</sup>	16,77 $\pm$ 1,91 <sup>ab</sup>	23,26 $\pm$ 4,12 <sup>a</sup>	13,94 $\pm$ 1,86 <sup>b</sup>	16,24 $\pm$ 1,33 <sup>b</sup>	13,96 $\pm$ 1,53 <sup>b</sup>	17,89 $\pm$ 3,91 <sup>ab</sup>
D4	14,48 $\pm$ 3,02 <sup>abc</sup>	18,78 $\pm$ 2,77 <sup>abc</sup>	15,7 $\pm$ 1,47 <sup>abc</sup>	11,88 $\pm$ 2,72 <sup>c</sup>	14,64 $\pm$ 3,46 <sup>abc</sup>	15,75 $\pm$ 2,52 <sup>abc</sup>	16,32 $\pm$ 3,34 <sup>abc</sup>	18,2 $\pm$ 5,66 <sup>abc</sup>	23,06 $\pm$ 5,16 <sup>a</sup>	13,84 $\pm$ 2,38 <sup>abc</sup>	13,45 $\pm$ 2,97 <sup>bc</sup>	19,19 $\pm$ 2,25 <sup>abc</sup>	21,29 $\pm$ 2,90 <sup>ab</sup>

Letras distintas (a-c) na linha indicam diferença estatística entre os tratamentos após 24h (D1), 48h (D2), 72 (D3) e 96h (D4) de refrigeração ( $p < 0,05$ ).

## **2.3 Artigo 3**

### **Revisão: Lipossomas de lecitina de soja na criopreservação do sêmen canino**

Edenara Anastácio da Silva<sup>1</sup>; Carine Dahl Corcini<sup>1-3</sup>; Izani Acosta Bonel<sup>1</sup>; Antonio Sergio Varela Junior<sup>1-3</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Capão do Leão, Brasil

<sup>3</sup>Reprodução Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, Brasil

Aceito para publicação na revista *Observatorio de la Economía Latinoamericana*

## **Revisão: Lipossomas de lecitina de soja na criopreservação do sêmen canino**

**Review: Soy lecithin liposomes in the cryopreservation of canine semen**

**Revisión: Liposomas de lecitina de soya en la criopreservación de semen canino**

### **Edenara Anastácio**

Mestre em Ciências Animais

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: edenara\_anastacio@hotmail.com

### **Carine Dahl Corcini**

Doutora em Biotecnologia

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: corcinicd@gmail.com

### **Izani Acosta Bonel**

Doutora em Ciências

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: izanibonel@hotmail.com

### **Antonio Sergio Varela Junior**

Doutor em Aquicultura

Instituição: Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Endereço: Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

E-mail: varelajras@gmail.com

## **RESUMO**

A criopreservação visa manter a funcionalidade e viabilidade espermática para aplicação em biotécnicas reprodutivas, porém o processo expõe os espermatozoides à crioinjúrias, danos estruturais e funcionais devido à redução da temperatura, além de estresse químico e oxidativo. O objetivo deste estudo é descrever os principais trabalhos já publicados que relacionam o uso de lipossomas de lecitina de soja na criopreservação de sêmen canino, bem como discorrer sobre os principais aspectos e aplicabilidade do assunto. A utilização de lipossomas de lecitina de soja em diluentes de criopreservação seminal em cães se demonstra promissora surge como uma alternativa ao uso de aditivos de origem animal, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) proveniente da gema de ovo, tendo como principal efeito citado a proteção da membrana plasmática espermática. Porém são necessários estudos mais aprofundados a fim de, determinar a concentração ideal das diferentes lecitinas,

padronização do método de adição aos diluentes, bem como análises mais aprofundadas de viabilidade e funcionalidade espermática *in vivo*.

**Palavras-chave:** Sêmen Canino, Lipossomas, Lecitina de Soja, Crioinjúrias, Membrana Espermática.

## ABSTRACT

Cryopreservation aims to maintain sperm functionality and viability for application in reproductive biotechnologies, but the process exposes sperm to cryoinjuries, structural and functional damage due to reduced temperature, and chemical and oxidative stress. The objective of this study is to describe the main works already published that relate the use of soy lecithin liposomes in the cryopreservation of canine semen, as well as to discuss the main aspects and applicability of the subject. The use of soy lecithin liposomes in seminal cryopreservation diluents in dogs has shown promise as an alternative to the use of additives of animal origin, such as low-density lipoprotein (LDL) from egg yolk, with the main effect cited as the protection of the sperm plasma membrane. However, more in-depth studies are needed to determine the ideal concentration of the different lecithins, standardization of the addition method to the diluents, as well as more in-depth analyses of sperm viability and functionality *in vivo*.

**Keywords:** Canine Semen, Liposomes, Soy Lecithin, Cryoinjuries, Sperm Membrane.

## RESUMEN

La criopreservación tiene como objetivo mantener la funcionalidad y viabilidad de los espermatozoides para su aplicación en biotecnologías reproductivas, pero el proceso expone a los espermatozoides a criolesiones, daños estructurales y funcionales debido a la reducción de la temperatura, además de estrés químico y oxidativo. El objetivo de este estudio es describir los principales trabajos ya publicados que relacionan el uso de liposomas de lecitina de soya en la criopreservación de semen canino, así como discutir los principales aspectos y aplicabilidad del tema. El uso de liposomas de lecitina de soja en diluyentes para la criopreservación seminal en perros se ha mostrado prometedor como alternativa al uso de aditivos de origen animal, como la lipoproteína de baja densidad (LDL) de la yema de huevo, siendo el principal efecto citado la protección de la membrana plasmática del esperma. Sin embargo, se necesitan estudios más profundos para determinar la concentración ideal de las diferentes lecitinas, estandarizar el método de adición a los diluyentes, así como análisis más profundos de la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides *in vivo*.

**Palabras clave:** Semen canino, liposomas, lecitina de soja, criolesiones, membrana espermática.

## 1 INTRODUÇÃO

Com a aproximação sentimental do homem com os cães, advento da cinofilia, avanços das técnicas de inseminação artificial, necessidade de manutenção da diversidade genética e manutenção de características desejáveis em determinadas raças, além do interesse no desenvolvimento de biotécnicas para carnívoros silvestres e humanos, nos quais a espécie

canina serve como modelo experimental, é necessária a descrição de métodos eficientes de criopreservação para a espécie.

A criopreservação visa manter a funcionalidade e viabilidade espermática através de processos sequenciais de redução da temperatura (Woods *et al.*, 2004). Possibilita a utilização de ejaculados por períodos relativamente longos (refrigeração), reduzindo riscos e custos com a aquisição de reprodutores, além de facilitar o transporte de material genético (De Souza Castelo; Frota; Silva, 2008). No entanto, o processo expõe os espermatozoides ao choque térmico e crioinjúrias, danos estruturais e funcionais devido à redução da temperatura, além de estresse químico e oxidativo (Watson; Morris, 1987). Esses danos diminuem a qualidade e capacidade fertilizante dos gametas.

Atualmente estudos salientam a manipulação de agentes estabilizadores de membrana, considerado o sítio primário de dano durante a criopreservação (Quinn, 1985). A diminuição da temperatura leva a alterações estruturais e organizacionais na membrana plasmática, que passa de uma fase fluida para gel devido a remoção de moléculas de água dos grupos polares (cabeça) dos fosfolipídios (Oldenhoef *et al.*, 2010). Adicionalmente, o estresse oxidativo induz a formação de grande quantidade de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou compostos que contém radicais livres (RL), como resultado há a perda do equilíbrio pró-oxidante/antioxidante e perda da qualidade espermática e potencial fertilizante (Guthrie; Welch, 2012).

Na preservação de sêmen canino, a gema de ovo é tradicionalmente utilizada como estabilizadora de membrana, ação atribuída à lipoproteína de baixa densidade (LDL), contudo a presença de grânulos, minerais e compostos como lipoproteína de alta densidade, inibem a respiração celular causando prejuízos à viabilidade espermática (Pace; Graham, 1974). Estudos demonstraram a eficiência do uso da LDL purificada na criopreservação de sêmen canino (Varela Junior *et al.*, 2009; Belala *et al.*, 2016a), porém a técnica demonstra-se inviável devido ao longo e laborioso processo de purificação. Neste contexto, o uso alternativo do plasma de gema de ovo, que é a fração solúvel obtida através da simples diluição e centrifugação do Tris-gema, demonstra-se como excelente substituto ao uso do Tris-gema, devido à presença da LDL, para proteção espermática durante a criopreservação do sêmen canino (Corcini *et al.*, 2016).

O efeito crioprotetor da LDL durante o resfriamento se deve principalmente interação das micelas na membrana plasmática dos espermatozoides, com influxo de fosfolipídios e colesterol na membrana celular (Bergeron *et al.*, 2004), formação de interface entre ácidos graxos e água (Anton *et al.*, 2003), além de formar complexos com proteínas do plasma

semanal, evitando a ação deletéria destas sobre as membranas (Manjunath *et al.*, 2002). Adicionalmente, Graham e Foote (1987) demonstraram que a fosfatidilserina e fosfatidilcolina são os fosfolipídios da gema de ovo mais eficientes na crioproteção espermática em sêmen de touros, propondo a reposição dos lipídeos de membrana e diminuindo os efeitos de transição de fase com a adição destes fosfolipídios em diluentes.

Apesar do amplo uso da gema de ovo em diluentes de criopreservação seminal de cães, existem limitações sanitárias, como risco de contaminação bacteriana e potencial desenvolvimento de doenças, além da variabilidade de sua composição, o que dificulta a padronização dos diluentes (Hermansson; Johannisson; Axner, 2021). Estudos recentes na criopreservação de sêmen canino estão focados na busca de alternativas ao uso da gema de ovo e seus subprodutos, visando o uso de outros componentes estabilizantes de membrana como lipossomas e substâncias sintéticas que possam mimetizar os efeitos da LDL (Bencharif; Dordas-Perpinya, 2020).

O objetivo deste trabalho é descrever os principais trabalhos que relacionam o uso de lipossomas de lecitina de soja na criopreservação de sêmen canino, bem como discorrer sobre os principais aspectos e aplicabilidade do assunto.

## **2 METODOLOGIA**

Este estudo foi realizado através de revisão bibliográfica online de artigos científicos. O instrumento de pesquisa dos artigos e a amostragem de literatura foi o National Center for Biotechnology Information (NCBI) e o Google Acadêmico, com os seguintes descritores: sêmen canino, crioprotetores e carotenóides.

## **3 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Lipossomas são pequenas vesículas coloidais compostas de lipídios anfipáticos, que em meio aquoso se agregam formando bicamadas lipídicas esféricas com compartimento interno aquoso (Balbino *et al.*, 2013). Estas estruturas possuem inúmeras vantagens em relação a LDL, com possibilidade de encapsular outras moléculas, ser semi-sintético, quimicamente definido e facilmente esterilizado e produzido para uso em diluentes seminais (Saadeldin *et al.*, 2020).

A transição da fase do estado físico da membrana espermática de fluida para gel durante a criopreservação é altamente dependente da composição de lipídios das membranas

espermáticas e, portanto, a fusão ou associação espontânea de lipossomas facilita a transferência de lipídios e colesterol, o que leva a rearranjo dos componentes da membrana celular e modifica as propriedades físico-químicas da membrana, melhorando assim a criotolerância dos espermatozoides (Ropke *et al.*, 2011; Sullivan; Saez, 2013). O efeito sobre as membranas é estritamente relacionado às propriedades físicas e químicas dos componentes e estrutura do lipossoma (Purdy; Graham, 2014; Zeron *et al.*, 2002).

O uso de lipossomas compostos de fosfatidilcolina comerciais extraída da gema de ovo tem-se mostrado como alternativas ao uso de LDL na criopreservação de sêmen de touros (Ropke *et al.*, 2011; Zeron *et al.*, 2002), garanhões (Pillet *et al.*, 2012) e cães em concentrações entre 2 e 6mM/mL (Belala *et al.*, 2016a; Belala *et al.*, 2016b). Na refrigeração de sêmen de perus, o uso de lipossomas composto de fosfatidilcolina extraída de gema de ovo marcada com fluorocromos, demonstraram através da análise de citometria de fluxo a incorporação destes fosfolipídios nas membranas espermáticas, com consequente aumento de fertilidade *in vivo* através de inseminação artificial (Long; Conn 2012).

Visando um estabilizador de membrana de origem vegetal, lecitinas de soja comerciais em diferentes apresentações e métodos de adição aos diluentes têm sido utilizadas em estudos na criopreservação de seminal de cães com resultados promissores, em concentrações variando de 1mg/mL a 10 mg/mL (Beccaglia; Anastasi; Luvoni, 2009; Axnér; Lagerson, 2016; Sánchez-Calabuig *et al.*, 2017; Dalmazzo *et al.*, 2018; Hermansson; Johannesson; Axner 2021). Porém, lecitinas de soja de diferentes fontes contém diferentes fosfolipídios e concentrações, e o método de preparo e adição ao diluente afetam os resultados (De Paz *et al.*, 2010). Analiticamente demonstra-se a necessidade de estudos mais aprofundados a fim de, determinar a concentração ideal de fosfatidilcolina de soja, padronização do método de adição aos diluentes de criopreservação seminal de cães, bem como análises mais aprofundadas de viabilidade e funcionalidade espermática.

#### **4 CONCLUSÃO**

A utilização de lipossomas de lecitina de soja em diluentes de criopreservação seminal em cães se demonstra promissora surge como uma alternativa ao uso de aditivos de origem animal, como a lipoproteína de baixa densidade (LDL) proveniente da gema de ovo, tendo como principal efeito citado a proteção da membrana plasmática espermática. Porém são necessários estudos mais aprofundados a fim de, determinar a concentração ideal das

diferentes lecitinas, padronização do método de adição aos diluentes, bem como análises mais aprofundadas de viabilidade e funcionalidade espermática *in vivo*.

## REFERÊNCIAS

- ANTON, M. et al. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 175–183, 2003.
- AXNÉR, E.; LAGERSON, E. Cryopreservation of dog semen in a tris extender with 1% or 2% soya bean lecithin as a replacement of egg yolk. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 2, p. 262-268, mar. 2016.
- BALBINO, T. A. et al. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical Engineering Journal**, v. 226, p. 423-433, jun. 2013.
- BECCAGLIA, M.; ANASTASI, P.; LUVONI, G. C. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. **Veterinary Research Communications**, v. 33, n. 1, p. 77-80, set 2009.
- BELALA, R. et al. The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4 °C. **Animal Reproduction Science**, v. 168, n. 2, p. 100-109, mai. 2016a.
- BELALA, R. et al. Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. **Research in Veterinary Science**, v. 106, p. 66–73, 1 jun. 2016b.
- BENCHARIF, D.; DORDAS-PERPINYA, M. Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last 20 years. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 2, p. 61-65, jul. 2020.
- BERGERON, A. et al. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 708-717, mar. 2004
- CORCINI, C. D. et al. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrologia**, v. 48, n. 1, p. 114-115, fev. 2016.
- DALMAZZO, A. et al. Effects of soy lecithin extender on dog sperm cryopreservation. **Animal Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 174-182, jun. 2018.
- DE PAZ, P. et al. Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 663-671, set. 2010.
- DE SOUZA CASTELO, T.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, mai. 2008.
- GRAHAM, J.; FOOTE, R. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42-52, fev. 1987.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1700-1708, nov. 2012.
- 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**, v. 7, n. 3, p. 812–819, fev. 2021.
- LONG, J.; CONN, T. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 C for 24 hours. **Poultry Science**, v. 91, n. 8, p. 1990-1996, jul. 2012.
- MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1250-1258,

out. 2002.

OLDENHOF, H. et al. Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 115-122, ago. 2010.

PACE, M.; GRAHAM, E. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of animal science**, v. 39, n. 6, p. 1144-1149, dez. 1974.

PILLET, E. et al. Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 268-279, jan 2012.

PURDY, P. H.; G., James K. Membrane modification strategies for cryopreservation. In: **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 337-342.

QUINN, P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v. 22, n. 2, p. 128-146, abr. 1985.

ROPKE, T. et al. Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1465-1472, ago. 2011.

SAADELDIN, I. M. et al. The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. **Animals (Basel)**, v. 10, n. 12, p. 2281, dez. 2020.

SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J. et al. Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. **Reproductive Biology**, v. 17, n. 3, p. 233-238, set. 2017.

SULLIVAN, R.; SAEZ, F. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. **Reproduction**, v. 146, n. 1, p. 21-35, jul. 2013.

VARELA JUNIOR, A. S. et al. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal reproduction science**, v. 115, n. 1-4, p. 323-327, out. 2009.

WATSON, P. F.; MORRIS, G. J. Cold shock injury in animal cells. **Symposia of the Society Experimental Biology**, v. 41, p. 311-340, 1987.

WOODS, E. J. et al. Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48, n. 2, p. 146–156, abr. 2004.

ZERON, Y.; et al. The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, v. 45, n. 2, p. 143-152, out. 2002.

### **3 Considerações Finais**

No primeiro estudo os lipossomas S75 e SCAR, na menor concentração testada, 1,25mM foram mais eficientes na manutenção da motilidade progressiva, parâmetros de distância, velocidade, retilinearidade, linearidade, coeficiente de oscilação, movimentação da cabeça e flagelar do sêmen canino refrigerado por 4 dias. O uso de lipossomas de fosfatidilcolina de soja e  $\beta$ -caroteno encapsulado diminuiu a produção de espécies reativas de oxigênio intracelular do sêmen canino refrigerado.

No segundo experimento o uso de 0,5mM do lipossoma S75 possibilitou as maiores médias de motilidade total e progressiva dos meios estudados neste experimento. Adicionalmente a mesma concentração de SCAR obteve motilidade progressiva, velocidade retilinearidade e lineariedade superior ao meio controle.

A revisão apresentada na terceira parte juntamente com nossos achados indicam que lipossomas formulados a base de fosfatidilcolina de soja demonstraram-se uma linha de pesquisa promissora na criobiologia celular. Mais estudos experimentando concentrações abaixo de 0,5mM de lipossomas de fosfatidilcolina de soja, e testes *in vivo* devem ser realizados, afim de determinar o uso dos meios de resfriamento propostos.

## Referências

- ALMBRO, M.; DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Effects of vitamin E and beta-carotene on sperm competitiveness. **Ecology Letters**, v. 14, n. 9, p. 891-895, 2011.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. T. Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: glycerol and other polyols as sole cryoprotectant. **Journal of Andrology**, v. 14, n. 3, p. 199-209, 1993.
- AMIDI, F. *et al.* The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell Tissue Bank**, v. 17, n. 4, p. 745-756, 2016.
- ANTON, M. *et al.* Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 175–183, 2003.
- AXNÉR, E.; LAGERSON, E. Cryopreservation of dog semen in a tris extender with 1% or 2% soya bean lecithin as a replacement of egg yolk. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 2, p. 262-268, 2016.
- BALBINO, T. A. *et al.* Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. **Chemical engineering journal**, n. 226, p. 423-433, 2013.
- BECCAGLIA, M.; ANASTASI, P.; LUVONI, G. C. Freezing of canine semen in an animal-free protein extender. **Veterinary Research Communications**, v. 33 n. 1, p. 77-80, 2009.
- BELALA, R. *et al.* Effect of equilibration time on the motility and functional integrity of canine spermatozoa frozen in three different extenders. **Research in Veterinary Science**, v. 106, p. 66-73, 2016a.
- BELALA, R. *et al.* The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4 degrees C. **Animal Reproduction Science**, v. 168, p. 100-109, 2016b.
- BENCHARIF, D.; DORDAS-PERPINYA, M. Canine semen cryoconservation: Emerging data over the last 20 years. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55 n. 2, p. 61-65, 2020.
- BERGERON, A. *et al.* Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major proteins of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. **Biology of Reproduction**, v. 70, n. 3, p. 708-717, 2004.
- CHRISTIANSEN, I. J. Reproduction in the Dog and Cat. **São Paulo, SP, Brazil**, p. 363, 1986.

- CORCINI, C. D. *et al.* Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrologia**, v. 48, n. 1, p. 114-115, 2016.
- DALMAZZO, A. *et al.* Effects of soy lecithin extender on dog sperm cryopreservation. **Animal biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 174-182, 2018.
- DE PAZ, P. *et al.* Development of extender based on soybean lecithin for its application in liquid ram semen. **Theriogenology**, 74, n. 4, p. 663-671, 2010.
- DE SOUZA CASTELO, T.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 2, n. 3, p. 67-75, 2008.
- DIAS RODRIGUES, T. V. *et al.* Carotenoid production by Rhodotorula mucilaginosa in batch and fed-batch fermentation using agroindustrial byproducts. **Food Technology and Biotechnology**, v. 57, n. 3, p. 388-398, 2019.
- EZZATI, M. *et al.* Influence of cryopreservation on structure and function of mammalian spermatozoa: an overview. **Cell Tissue Bank**, v. 21, n. 1, p. 1-15, 2020.
- FANG, Y. *et al.* Effects of astaxanthin supplementation on the sperm quality and antioxidant capacity of ram semen during liquid storage. **Small Ruminant Research**, v. 130, p. 178-182, 2015.
- FARZAN, M.; CHAMANI, M.; VARNASERI, H. The antioxidant effect of astaxanthin on quantitative and qualitative parameters of bull sperm. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 4, n. 4, p. 425-430, 2014.
- GAVELLA, M.; LIPOVAC, V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. **Archives of Andrology**, v. 28, n. 2, p. 135-141, Mar-Apr 1992.
- GRAHAM, J.; FOOTE, R. Effect of several lipids, fatty acyl chain length, and degree of unsaturation on the motility of bull spermatozoa after cold shock and freezing. **Cryobiology**, v. 24, n. 1, p. 42-52, 1987.
- GRIVEAU, J. F.; LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, n. 2, p. 61-69, Apr 1997.
- GUTHRIE, H. D.; WELCH, G. R. Effects of reactive oxygen species on sperm function. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1700-1708, nov. 2012.
- 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**, v. 7, n. 3, p. 812-819, 2021.
- JONES, R.; MANN, T.; SHERINS, R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. **Fertility and Sterility**, v. 31, n. 5, p. 531-537, 1979.

- KEOGH, L. M.; BYRNE, P. G.; SILLA, A. J. Effect of long-term dietary beta-carotene supplementation on sperm concentration and motility in an endangered amphibian. **Animal Reproduction Science**, v. 195, p. 259-265, 2018.
- KIRTI, K. et al. Colorful world of microbes: carotenoids and their applications. **Advances in Biology**, v. 2014, n. 1, p. 837891, 2014.
- KUTLUYER, F. et al. Cryopreservation of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa: effects of extender supplemented with different antioxidants on sperm motility, velocity and fertility. **Cryobiology**, v. 69, n. 3, p. 462-466, 2014.
- LACA, A.; PAREDES, B.; RENDUELES, M.; DÍAZ, M. Egg yolk plasma: Separation, characteristics and future prospects. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 7-10, 2015.
- LECLERC, P.; DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. Regulation of protein-tyrosine phosphorylation and human sperm capacitation by reactive oxygen derivatives. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 4, p. 643-656, 1997.
- LEE, E.; KIM, D. Effects of Astaxanthin on Miniature Pig Sperm Cryopreservation. **BioMed Research International**, v. 2018, n. 1, p. 6784591, 2018.
- LI, M.-C. et al. Men's Intake of Vitamin C and β-Carotene Is Positively Related to Fertilization Rate but Not to Live Birth Rate in Couples Undergoing Infertility Treatment. **The Journal of Nutrition**, v. 149, n. 11, p. 1977-1984, 2019.
- LONG, J.; CONN, T. Use of phosphatidylcholine to improve the function of turkey semen stored at 4 C for 24 hours. **Poultry Science**, v. 91, n. 8, p. 1990-1996, 2012.
- MANJUNATH, P. et al. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 4, p. 1250-1258, 2002.
- MARTINELLI, C. et al. Antioxidants and Nanotechnology: Promises and Limits of Potentially Disruptive Approaches in the Treatment of Central Nervous System Diseases. **Advanced Healthcare Materials**, v. 9, n. 3, p. e1901589, 2020.
- MARTÍNEZ-PASTOR, F. et al. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 67-78, 2010.
- MEDEIROS, C. M. et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327-344, 2002.
- MEHDIPOUR, M. et al. Effect of crocin and naringenin supplementation in cryopreservation medium on post-thaw rooster sperm quality and expression of apoptosis associated genes. **PLoS One**, v. 15, n. 10, p. e0241105, 2020.
- MICHELON, M. et al. Structural characterization of β-carotene-incorporated nanovesicles produced with non-purified phospholipids. **Food Research International**, v. 79, p. 95-105, 2016.

- NAJAFI, D. *et al.* Effect of astaxanthin nanoparticles in protecting the post-thawing quality of rooster sperm challenged by cadmium administration. **Poultry Science**, v. 99, n. 3, p. 1678-1686, 2020.
- OLDENHOF, H. *et al.* Membrane permeability parameters for freezing of stallion sperm as determined by Fourier transform infrared spectroscopy. **Cryobiology**, v. 61, n. 1, p. 115-122, 2010.
- OTERO, D. M. *et al.* Carotenoid-producing yeasts in the Brazilian biodiversity: Isolation, identification and cultivation in agroindustrial waste. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 1, p. 117-129, 2019.
- PACE, M.; GRAHAM, E. Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. **Journal of Animal Science**, v. 39, n. 6, p. 1144-1149, 1974.
- PERRY, C. T. *et al.* Amides as cryoprotectants for the freezing of Brycon orbignyanus sperm. **Aquaculture**, v. 508, p. 90-97, 2019.
- PETRUSKA, P.; CAPCAROVA, M.; SUTOVSKY, P. Antioxidant supplementation and purification of semen for improved artificial insemination in livestock species. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**, v. 38, n. 6, p. 643-652, 2014.
- PILLET, E. *et al.* Liposomes as an alternative to egg yolk in stallion freezing extender. **Theriogenology**, v. 77, n. 2, p. 268-279, Jan 15 2012.
- PURDY, P. H.; G., James K. Membrane modification strategies for cryopreservation. In: **Cryopreservation and freeze-drying protocols**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 337-342.
- QAMAR, A. Y. *et al.* The effect of astaxanthin supplementation on the post-thaw quality of dog semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 9, p. 1163-1171, 2020.
- QUINN, P. J. A lipid-phase separation model of low-temperature damage to biological membranes. **Cryobiology**, v. 22, n. 2, p. 128-146, 1985.
- ROPKE, T. *et al.* Liposomes for cryopreservation of bovine sperm. **Theriogenology**, v. 76, n. 8, p. 1465-1472, 2011.
- SAADELDIN, I. M. *et al.* The Current Trends in Using Nanoparticles, Liposomes, and Exosomes for Semen Cryopreservation. **Animals (Basel)**, v. 10, n. 12, 2020.
- SÁNCHEZ-CALABUIG, M. J.; MAILLO, V.; BELTRÁN-BREÑA, P.; DE LA FUENTE MARTÍNEZ, J. *et al.* Cryopreservation of canine sperm using egg yolk and soy bean based extenders. **Reproductive biology**, v. 17, n. 3, p. 233-238, 2017.
- SHEIKHOLESLAMI S.A. *et al.* The evaluation of lycopene and cysteamine supplementation effects on sperm and oxidative stress parameters during chilled storage of canine semen. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 55, n. 9, p. 1229-1239, 2020

SILVA, E. F. *et al.* Reproductive toxicology of 2, 4 dinitrophenol in boar sperm. **Toxicology in Vitro**, v. 35, p. 31-35, 2016.

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

TIZKAR, B. *et al.* Effects of dietary supplementation with astaxanthin and beta-carotene on the semen quality of goldfish (*Carassius auratus*). **Theriogenology**, v. 84, n. 7, p. 1111-1117, 2015.

VARELA JUNIOR, A. S. *et al.* Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science**, v. 115, n. 1-4, p. 323-327, 2009.

WATSON, P. F.; MORRIS, G. J. Cold shock injury in animal cells. **Symposia of the Society for Experimental Biology**, v. 41, p. 311-340, 1987.

WOODS, E. J. *et al.* Fundamental cryobiology of reproductive cells and tissues. **Cryobiology**, v. 48, n. 2, p. 146–156, abr. 2004.

ZANIN, M. *et al.* Tricaine methanesulfonate (MS-222) on the spermatic quality of zebrafish, *Danio rerio*. **Aquaculture**, v. 533, p. 736090, 2021.

ZERON, Y. *et al.* The effect of liposomes on thermotropic membrane phase transitions of bovine spermatozoa and oocytes: implications for reducing chilling sensitivity. **Cryobiology**, v. 45, n. 2, p. 143-152, 2002.