



## Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão

*Hen's egg yolk and the protective action of its low density lipoproteins on semen cryopreservation: a review*

M.M. Neves<sup>1,3</sup>, M. Henry<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa UFV, Viçosa, MG, Brasil.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Minas Gerais UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

<sup>3</sup>Correspondência: [mariana.mneves@ufv.br](mailto:mariana.mneves@ufv.br)

### Resumo

Desde 1939, a gema do ovo tem sido utilizada na biotecnologia da reprodução como ingrediente essencial nos meios diluidores para resfriamento e congelamento de espermatozoides em várias espécies domésticas. A gema é formada por lipoproteínas, livetinas e fosvitinas, encontradas em duas frações facilmente separáveis pelo método de centrifugação: o grânulo e o plasma. Acredita-se que as lipoproteínas de baixa densidade, presentes no plasma, sejam as responsáveis por sua ação crioprotetora. Esta revisão enfoca a composição química do ovo de galinha e de sua gema, mostrando, cronologicamente, como foram desenvolvidas as hipóteses existentes sobre seu mecanismo de ação no congelamento de sêmen.

**Palavras-chave:** congelamento, lipídeos, proteção espermática, proteínas do plasma seminal, sêmen.

### Abstract

*Since 1939, the hen's egg yolk has been used as an essential ingredient in extenders for cooling and freezing sperm of several domestic species, in reproductive biotechnology protocols. The egg yolk is composed of lipoproteins, livetins, and lipovitins. These components can be easily separated by centrifugation in the granular and the plasmatic fractions. It has been acknowledged that the low density lipoproteins present in the plasma are responsible for the protective effects of the egg yolk. This review focuses on the chemical compound of the egg yolk and historical aspects of the hypotheses that try to explain the mechanism of action of the egg yolk on sperm cryopreservation.*

**Keywords:** bovine seminal proteins, freezing, lipids, semen, sperm protection.

### Introdução

A gema do ovo possui proteínas de alto valor biológico, ácidos graxos essenciais, fosfolipídeos e glicerol de grande aplicação industrial e biomédica. Pesquisas na área da engenharia de alimentos mostram que algumas propriedades funcionais da gema, como emulsificação, coagulação e gelatinização, são responsáveis pela estrutura e estabilidade de maioneses, cremes e molhos para saladas (Sousa et al., 2007).

Na reprodução animal, a descoberta dos efeitos benéficos da gema de ovo sobre a fertilidade do sêmen diluído, em 1939, por Phillips, liderou o seu uso nos meios diluidores de bovinos. Em 1942, Lasley et al. observaram a capacidade da gema em proteger os espermatozoides contra o choque térmico. A descoberta de que o sêmen bovino poderia ser congelado com o glicerol, por Polge et al., em 1949, direcionou as pesquisas para o estudo das qualidades protetoras da gema de ovo (Pace e Grahman, 1974).

Desde então, a gema é utilizada e aceita como um ingrediente essencial em diluidores empregados no congelamento do sêmen. No entanto, o mecanismo pelo qual a gema protege os espermatozoides ainda não foi elucidado. Vários estudos têm demonstrado que as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) são as responsáveis pela resistência ao choque térmico, por preservar a motilidade e a integridade do DNA nuclear e das membranas espermáticas (Manjunath et al., 2002; Moussa et al., 2002).

Nesta revisão, serão abordadas as características da composição química do ovo de galinha e de sua gema, bem como as possíveis hipóteses sobre o mecanismo de ação das LDL na proteção espermática durante o congelamento.

### Origem e composição básica do ovo de galinha

No ovo da ave, caracterizado como um ovo panlécito, há uma segregação bem demarcada entre citoplasma e vitelo. O vitelo branco, acumulado durante o crescimento ovocitário, nutre o embrião durante o seu desenvolvimento. Antes da ovulação, há a deposição do vitelo branco, composto por água e proteínas, e do



vitelo amarelo, rico em carotenoides e gorduras, o qual se alterna em círculos claros e escuros, de acordo com a luminosidade do dia. O ovo recém-depositado já possui casca, membranas da casca, albúmen (clara) e vitelo (gema; Garcia e Fernández, 2001).

Como os tecidos animais, os ovos são formados pelas porções líquida, representada pela água, e sólida, composta de proteínas, gorduras, carboidratos e minerais. Esta composição é o resultado de um complexo processo biológico que envolve a síntese, o transporte e a deposição de substâncias e está intimamente relacionado com a produção da gema, já que esta não é totalmente formada no ovário. A composição varia de acordo com o passar do tempo de sua produção. Na fase inicial de produção, a gema nova contém, principalmente, gorduras neutras e pouco dos componentes da gema de ovo verdadeira. A fase intermediária caracteriza-se pela grande quantidade de proteínas e pela baixa quantidade de gorduras, enquanto a fase final, que caracteriza a gema do ovo verdadeira, apresenta alto conteúdo lipídico, que é depositado tardiamente, durante seu crescimento ativo (Romanoff e Romanoff, 1963; Kuksis, 1992; Burley et al., 1993).

A água da gema do ovo é oriunda do plasma sanguíneo, que entra no interior dele através de canais específicos ou durante a internalização de outros constituintes. As proteínas solúveis ou embebidas em lipoproteínas são derivadas das proteínas séricas maternas sintetizadas no fígado, internalizadas pelos ovócitos, por via endocítica mediada por receptores, e parcialmente processadas. Já os lipídeos são oriundos da dieta, vindos diretamente dos alimentos ou indiretamente do metabolismo hepático de carboidratos e outros metabólitos. Seu transporte do sangue para a gema é promovido por meio das lipoproteínas sanguíneas. Os triglicérides e os fosfolipídeos constituem a principal fonte de energia e estrutura lipídica para o desenvolvimento embrionário (Burley et al., 1993; Jolivet et al., 2006).

### Composição química específica da gema do ovo de galinha

A gema do ovo é composta principalmente por 68% de LDL, 16% de lipoproteínas de alta densidade, 10% de livetinas e 4% de fosvitinas, localizadas em duas frações facilmente separáveis, os grânulos e o plasma. O plasma corresponde a 78% da matéria seca da gema, enquanto os grânulos representam 22%. Na matéria seca da gema, podem-se encontrar 33% de proteínas e 63% de lipídeos, divididos em triglicérides (43%), colesterol (2,6%) e fosfolipídeos (18%), sendo estes compostos por 16% de fosfatidilcolina e 2% de fosfatidiletalona (Anton e Gandemer, 1997; Jolivet et al., 2006).

Os grânulos são estruturas microscópicas, irregulares e insolúveis na gema. São constituídos de 70% de lipovitelinas, que correspondem às lipoproteínas de alta densidade, 16% de fosvitinas e 12% de LDL. Eles representam 19-25% da matéria seca, 42-48% do conteúdo proteico e 15% dos fosfolipídeos da gema. A vitelogenina, uma lipoproteína sintetizada no fígado materno por estímulo estrogênico, sofre um processo enzimático durante sua passagem do plasma sanguíneo para o interior da gema, originando as lipovitelinas e as fosvitinas. A molécula de lipovitelina é parecida com outras proteínas solúveis de formato globular, sendo uma mistura de dois componentes,  $\alpha$  e  $\beta$ -lipovitelinas, que se diferem por seu teor de fósforo. Já as fosvitinas são fosfoglicoproteínas com 10% de fósforo em sua constituição e 5-6% de resíduos glicídicos. Também apresentam dois componentes,  $\alpha$  e  $\beta$ , que se diferenciam pelo teor de fósforo em sua composição. Estes precipitados se juntam para formar os grânulos, sendo incorporadas pequenas quantidades de LDL durante este processo (Dyer-Hurdon e Nnanna, 1993; Sirvente et al., 2007).

O plasma da gema contém proteínas solúveis, sendo separado dos grânulos por meio da centrifugação. Este é composto por 85% de LDL e 15% de livetinas. As livetinas são proteínas que não estão intimamente associadas aos lipídeos, sendo de três tipos principais:  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ -livetinas. Sua estrutura química é semelhante às proteínas do plasma sanguíneo, como albumina,  $\alpha$ -2-glicoproteínas, transferrinas e  $\gamma$ -globulinas. Diferentemente de outras proteínas da gema, as livetinas não são produzidas por indução hormonal, sendo as  $\alpha$  e  $\beta$ -livetinas produzidas no fígado, e a  $\gamma$ -livetina na medula óssea. Existem receptores específicos no oolema que controlam a entrada dessas proteínas na gema (Kuksis, 1992; Burley et al., 1993).

Com relação às lipoproteínas, vários estudos mostram que a lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL) é a principal fonte de colesterol e de outros lipídeos para os ovócitos. Sua produção no fígado aumenta consideravelmente durante a maturidade sexual da ave, devido à secreção de estrógeno. A VLDL contém mais de 80% de massa lipídica, composta principalmente por espécies apolares, como ésteres de colesterol e triacilglicérides. As apoproteínas presentes estão representadas pelas apoproteínas-B e VLDL-II. A apoproteína-B, semelhante à apoproteína B-100 presente no plasma sanguíneo humano, também se encontra na molécula da LDL, sendo a VLDL-II a responsável por garantir a especificidade dos receptores das lipoproteínas de muito baixa densidade (Evans e Burley, 1987; Jolivet et al., 2006).

Enquanto as lipoproteínas de alta densidade possuem 80% de proteínas na sua constituição contra 20% de lipídeos, as lipoproteínas de baixa densidade são compostas por cerca de 11-17% de proteínas e 89% de lipídeos, sendo estes divididos em triacilglicerol (69%), fosfolipídeos (27%), colesterol e ésteres de colesterol (4%; Anton e Gandemer, 1997; Sousa et al., 2007).

As LDL apresentam-se como uma microemulsão biológica com importantes partículas envolvidas no



transporte e no metabolismo de colesterol. São formadas por uma estrutura esférica de 17-60nm de diâmetro, apresentando um centro composto de triglicerídeos e ésteres de colesterol, rodeado por fosfolípidos e apoproteínas, sendo estas de pelo menos seis tipos diferentes. Cerca de 20% do peso total da partícula é atribuído à apoproteína B-100, que é responsável pelo reconhecimento das LDL por receptores específicos e pelo controle do seu metabolismo (Reisinger e Atkinson, 1990). Como seus grupos hidrofílicos estão orientados para a superfície e os hidrofóbicos estão voltados para o interior, a LDL se mostra muito solúvel em água e insolúvel em solventes orgânicos, apresentando densidade de 0,982 g/mL (Martinet et al., 2003).

Anton et al. (2003) citaram que essas lipoproteínas, nas suas propriedades físicas e estruturais, possuem alta solubilidade e boa estabilidade, não demonstrando alterar sua estrutura em temperaturas extremas (-80 a 75°C). Evans et al. (1968) verificaram que as proteínas presentes nas LDL, com alto e baixo peso molecular, são as mesmas, variando apenas o conteúdo de triglicerídeos e fosfolípidos. O tamanho dessas lipoproteínas aumenta devido ao aumento de lípidos no interior da molécula e ao aumento de fosfolípidos entre as proteínas. A microscopia eletrônica suporta esta teoria, pois evidencia que há a existência de uma estrutura mosaica em sua superfície, onde lípidos e proteínas ocupam áreas distintas e não interagem fortemente juntos, sendo os fosfolípidos responsáveis pela estabilidade lipídica da molécula (Martinet et al., 2003).

### Mecanismos de proteção das LDL no congelamento de sêmen

O esclarecimento do papel de lípidos e proteínas presentes na LDL sobre a proteção da membrana espermática pode, indiretamente, evidenciar a natureza das mudanças de membrana que ocorrem durante o resfriamento e o congelamento (Watson, 1981a). Para isso, fosfolípidos, fosfatidilcolina, frações lipoproteicas e lipoproteínas específicas passaram a ser estudados, a fim de se entender os mecanismos de crioproteção da gema. Em 1974, Pace e Graham tentaram purificar e estabelecer a fração da gema responsável pela proteção dos espermatozoides bovinos congelados. Por meio de várias centrifugações e diálises, os pesquisadores conseguiram separar a gema em três frações, a granular, a fração solúvel crua e a fração de baixa densidade crua. Os resultados obtidos mostraram que sêmen congelado em meio tampão sem gema, na presença ou não do glicerol, não foi capaz de manter a motilidade espermática, ao contrário de meios tamponados acrescidos de gema, na ausência do glicerol. Nenhum componente protetor foi encontrado nas frações solúvel crua e granular, diferentemente do observado na fração de baixa densidade crua, que protegeu tão bem quanto a gema de ovo total (Pace e Graham, 1974).

A partir daí, várias hipóteses foram formadas, a fim de tentar esclarecer o possível mecanismo de ação das LDL. Foulkes (1977) propôs que os componentes da gema se ligariam firmemente às membranas espermáticas bovinas, exercendo papel protetor ao estabilizarem a membrana durante o resfriamento, ou ao conseguirem manter a pressão coloidal do meio externo. Esta teoria foi reforçada por MacDonald e Foulkes (1981), ao investigarem a interação das LDL com espermatozoides bovinos e proteínas seminais, por meio de teste de fluorescência.

Porém, resultados de outros estudos causaram controvérsias em relação a essa hipótese ao sugerirem que os fosfolípidos presentes nas LDL protegeriam os espermatozoides pela formação de um filme protetor na superfície celular ou substituiriam fosfolípidos perdidos ou danificados da membrana espermática durante o congelamento (Foulkes et al., 1980; Quinn et al., 1980; Graham e Foote, 1987).

Ao estudar o papel das LDL sobre espermatozoides ovinos resfriados a 5°C, Watson (1981b) verificou que ocorre forte ligação entre a membrana espermática e as lipoproteínas a partir de seus componentes proteicos. Cookson et al. (1984) afirmaram que essas ligações são muito fortes, resistindo a mais de dez processos de lavagens, e que a remoção do conteúdo lipídico das lipoproteínas implicaria a redução de sua capacidade ligante com as membranas espermáticas.

Posteriormente, Parks et al. (1981) verificaram que as células congeladas em meios diluidores sem gema perdem moléculas de colesterol e fosfolípidos, em resposta ao choque térmico. Neste processo, a gema e as LDL protegeriam os espermatozoides ao doarem lípidos para a membrana plasmática, contribuindo para a não alteração da razão colesterol/fosfolípidos.

Cookson et al. (1984), ao pesquisarem a interação das lipoproteínas da gema com espermatozoides bovinos utilizando picos cromatográficos da fração lipoproteica e imuno-histoquímica, verificaram que há contenção de certas lipoproteínas firmemente ligadas à membrana espermática, existindo limite na ligação. Dos três picos cromatográficos obtidos, o terceiro se mostrou mais eficiente na ligação com o espermatozoide, assim como observado por Foulkes (1977) e Stewart (1977).

A ligação entre a fração de LDL com a membrana espermática, via ligação proteica, foi observada por Vishwanath et al. (1992). Estes autores afirmaram que a proteção contra o choque térmico está altamente relacionada à concentração de lípidos na molécula, tornando-se fator determinante. Entretanto, como a ligação ocorre primariamente via proteínas, estas, com carga positiva, apresentam grande capacidade de ligação com as proteínas de carga negativa da membrana espermática dos bovinos.

De Leeuw et al. (1993) formularam várias hipóteses sobre o mecanismo de crioproteção por adição de



lipídeos exógenos. Entre elas, que os lipídeos poderiam se associar à superfície da membrana plasmática ou poderiam modificar a composição da membrana. Ao se associarem à membrana, os lipídeos exógenos mudam o momento da fase de transição, diminuindo a sensibilidade da membrana ao resfriamento. Porém, Ricker et al. (2006), ao avaliarem a fase de transição em espermatozoides equinos na ausência e presença de crioprotetores à base de lipídeos, verificaram que não há incorporação dessas substâncias na membrana espermática, devido ao comportamento independente destes com os lipídeos de membrana, durante a fase de transição. Eles sugerem que as fortes ligações dos lipídeos exógenos ocorrem apenas na superfície da membrana, o que promoveria uma barreira física aos danos do congelamento e descongelamento, prevenindo a fase de separação da membrana por influência do empacotamento.

Outra hipótese seria a de que as lipoproteínas parecem competir com peptídeos catiônicos do plasma seminal pela ligação com a membrana plasmática do espermatozoide, protegendo-o. Vários estudos observaram que peptídeos catiônicos do plasma seminal atuam fortemente sobre as proteínas da membrana espermática, desestabilizando-a, e sugeriram que substâncias catiônicas da gema do ovo e do leite desnatado poderiam proteger a membrana espermática bovina dessa ligação indesejada (Vishwanath et al., 1992). Este fato também foi verificado por um grupo de pesquisadores que observaram alta afinidade das LDL com as proteínas do plasma seminal bovino (BSPs), o que impede que estas se liguem ao espermatozoide e, conseqüentemente, desencadeiem os processos de capacitação e hipermotilidade espermática. Isso é importante porque o plasma seminal, que facilita o transporte do espermatozoide no trato genital feminino, também contém fatores que influenciam a motilidade e a fertilidade, sendo deletérios ao sêmen estocado, por reduzirem a viabilidade espermática (Killian et al., 1993; Thérien et al., 1998; Bergeron e Manjunath, 2006).

A principal fração proteica do plasma seminal bovino é representada pela família de proteínas designadas como proteína do plasma seminal (BSP)-A1, BSP-A2, BSP-A3 e BSP-30. Essas proteínas se ligam às fosfatidilcolinas da membrana plasmática no momento da ejaculação, potencializando o fenômeno de capacitação, o que desfavorece o congelamento. As BSPs induzem mudanças no fluxo de substâncias na membrana plasmática, estimulando a saída do colesterol e dos fosfolipídeos, a qual é dependente do tempo e da concentração (Manjunath e Thérien, 2002).

Manjunath et al. (2002) verificaram que a capacidade de formação de ligações é dependente da concentração de proteínas, sendo que quanto maior a concentração de proteínas seminais, menor a ocorrência de ligações. O complexo BSPs-lipoproteínas de baixa densidade caracteriza-se pela rapidez, estabilidade, especificidade e por ser dose-dependente. Essa interação pode ser benéfica para a proteção e estocagem dos espermatozoides nos estados líquido e congelado (Bergeron et al., 2004).

Mesmo sem uma conclusão sobre o seu real mecanismo de ação, vários experimentos têm sido desenvolvidos com as LDL no congelamento do sêmen de várias espécies (Moussa et al., 2002; Neves, 2008), obtendo-se resultados semelhantes ou superiores aos da gema de ovo de galinha adicionada ao meio diluidor, o que mostra que este pode ser o caminho para a produção de meios diluidores com composição conhecida e sanitariamente controlados.

### Considerações finais

A gema do ovo é rica em complexos proteicos facilmente separáveis, sendo a fração granular composta por estruturas microscópicas, irregulares e insolúveis, enquanto a fração do plasma contém proteínas solúveis, como a LDL. A LDL é formada por uma estrutura esférica rica de triglicéride e ésteres de colesterol, rodeada por fosfolipídeos e apoproteínas de vários tipos. Apesar das diferentes hipóteses existentes sobre seu papel na crioproteção espermática, esta tem se mostrado, no mínimo, tão eficiente quanto a gema do ovo na manutenção da viabilidade espermática.

### Referências

- Anton M, Gandemer G.** Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. *J Food Sci*, v.62, p.484-487, 1997.
- Anton M, Martinet V, Dalgalarondo M, Beaumal E, David-Briand E, Rabesona H.** Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chem*, v.83, p.175-183, 2003.
- Bergeron A, Crête M, Brindle Y, Manjunath P.** 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. *Biol Reprod*, v.70, p.708-717, 2004.
- Bergeron A, Manjunath P.** New insights towards understanding the mechanisms of sperm protection by egg yolk and milk. *Mol Reprod Dev*, v.73, p.1338-1344, 2006.
- Burley RW, Evans AJ, Pearson JA.** Molecular aspects of the synthesis and deposition of hen's egg yolk with special reference to low-density lipoprotein. *Poult Sci*, v.72, p.850-855, 1993.



- Cookson AD, Thomas AN, Foulkes JA.** Immunochemical investigation of the interaction of egg-yolk lipoproteins with bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.70, p.599-604, 1984.
- De Leeuw FE, De Leeuw, AM, Den Daas, JHG, Colenbrander B, Verkleij AJ.** Effects of various cryoprotective agents and membrane-stabilizing compounds of bull sperm membrane integrity after cooling and freezing. *Cryobiology*, v.30, p.32-40, 1993.
- Dyer-Hurdon JN, Nnanna IA.** Cholesterol content and functionality of plasma and granules fractionated from egg yolk. *J Food Sci*, v.58, p.1277-1281, 1993.
- Evans AJ, Burley RW.** Proteolysis of apoprotein B during the transfer of very low density lipoprotein from hen's blood to egg yolk. *J Biol Chem*, v.262, p.501-504, 1987.
- Evans RJ, Bandemer SL, Davidson JA, Heinlein K, Vaghefi SS.** Binding of lipid to protein in the low-density lipoprotein from the hen's egg. *Biochim Biophys Acta*, v.164, p.566-574, 1968.
- Foulkes JA.** The separation of lipoproteins from egg yolk and their effect on the motility and integrity of bovine spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.49, p.277-284, 1977.
- Foulkes JA, Stewart DL.** Fertility of dairy cattle after artificial insemination with semen frozen in a lipoprotein diluent. *J Reprod Fertil*, v.51, p.175-177, 1977.
- Foulkes JA, Sweasey D, Goodey RG.** Fertility of bull spermatozoa in egg-yolk diluents of varied lipid fatty acid composition. *J Reprod Fertil*, v.60, p.165-169, 1980.
- Garcia SML, Fernández CG.** *Embriologia*. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 416p.
- Graham JK, Foote RH.** 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, p.42-52, 1987.
- Jolivet P, Boulard C, Beaumal V, Chardot T, Anton M.** Protein components of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *J Agric Food Chem*, v.54, p.4424-4429, 2006.
- Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA.** Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, v.49, p.1202-1207, 1993.
- Kuksis A.** Yolk lipids. *Biochim Biophys Acta*, v.1124, p.205-222, 1992.
- MacDonald BJ, Foulkes JA.** A spectrofluorometric investigation, using 1-anilino-naphthalene-8-sulphonate, of the interaction between washed bovine spermatozoa and seminal plasma or egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil*, v.63, p.407-414, 1981.
- Manjunath P, Nauc V, Bergeron A, Ménard M.** Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. *Biol Reprod*, v.67, p.1250-1258, 2002.
- Manjunath P, Thérien I.** Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol*, v.53, p.109-119, 2002.
- Martinet V, Saulnier P, Beaumal V, Courthaudon JL, Anton M.** Surface properties of hen egg yolk low-density lipoproteins spread at the air-water interface. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, v.31, p.185-194, 2003.
- Moussa M, Martinet V, Trimeche A, Tainturier D, Anton M.** Low density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.57, p.1695-1706, 2002.
- Neves MM.** Extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de *Gallus domesticus* e sua aplicação na criopreservação do sêmen canino. 2008. 116f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, Belo Horizonte, MG, 2008.
- Pace MM, Graham EF.** Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*, v.39, p.1144-1149, 1974.
- Parks, JE, Meacham, TN, Saacke RG.** Cholesterol and phospholipids of bovine spermatozoa. I. Selection of a PIPES-Buffered diluent for evaluating the effect of egg yolk lipoprotein on sperm cholesterol and phospholipids. *Biol Reprod*, v.24, p.393-398, 1981.
- Quinn PJ, Chow PYW, White IG.** Evidence that phospholipid protects ram spermatozoa from cold shock at a plasma membrane site. *J Reprod Fertil*, v.60, p.403-407, 1980.
- Reisinger RE, Atkinson D.** Phospholipid/cholesteryl ester microemulsions containing unesterified cholesterol: model systems for low-density lipoproteins. *J Lipid Res*, v.31, p.849-858, 1990.
- Ricker JV, Linfor JJ, Delfino WJ, Kysar P, Scholtz EL, Tablin F, Crowe JH, Ball BA, Meyers SA.** Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. *Biol Reprod*, v.74, p.359-365, 2006.
- Romanoff AL, Romanoff AJ.** *The avian egg*. New York: John Wiley & Sons, 1963.
- Sirvente H, Beaumal V, Gaillard C, Bialek L, Hamm D, Anton M.** Structuring and functionalization of dispersions containing egg yolk, plasma and granules induced by mechanical treatments. *J Agric Food Chem*, v.55, p.9537-9544, 2007.
- Sousa RCS, Coimbra JSR, Rojas EEG, Minim LA, Oliveira FC, Minim VPR.** Effect of pH and salt concentration on the solubility and density of egg yolk and plasma egg yolk. *Food Sci Technol*, v.40, p.1253-1258, 2007.
- Thérien I, Moreau R, Manjunath P.** Major proteins of bovine seminal plasma and high-density lipoprotein induce cholesterol efflux from epididymal sperm. *Biol Reprod*, v.59, p.768-776, 1998.



Neves e Henry. Gema do ovo de galinha e a ação protetora de suas lipoproteínas de baixa densidade na criopreservação do sêmen: uma revisão.

---

**Vishwanath R, Shannon P, Curson B.** Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. *Anim Reprod Sci*, v.29, p.185-194, 1992.

**Watson PF.** The effects of cold shock on sperm membranes. In: Clarke A, Morris GJ (Ed.). *Effects of low temperatures on biological membranes*. London: Academic Press, 1981a. p. 89-218.

**Watson PF.** The roles of lipid and protein in the production of ram spermatozoa at 5°C by egg-yolk lipoprotein. *J Reprod Fertil*, v.62, p.483-492, 1981b.

---