



Pontos críticos na metodologia de extração das lipoproteínas de baixa densidade e suas perspectivas de uso no congelamento de sêmen

Critical steps in the extraction methodology of low density lipoproteins and their prospects for use on semen cryopreservation

M.M. Neves^{1,4}, L.G.D. Heneine², M. Henry³

¹Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, MG, Brasil.

²Fundação Ezequiel Dias (Funed), Belo Horizonte, MG, Brasil

³Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brasil.

⁴Correspondência: mariana.mneves@ufv.br

Resumo

As lipoproteínas de baixa densidade são consideradas as principais responsáveis pelo papel protetor da gema do ovo de galinha na criopreservação de espermatozoides em mamíferos. A extração dessas lipoproteínas é um método fácil, rápido e eficiente, porém é importante enfatizar seus pontos críticos, a fim de se evitarem falhas durante o processo e uma possível contaminação da fração lipoproteica. Vários experimentos têm testado o uso de lipoproteínas de baixa densidade adicionadas aos meios diluidores em substituição à gema do ovo total. Os resultados mostram que meios contendo as lipoproteínas de baixa densidade são capazes de preservar parâmetros espermáticos como motilidade, integridade estrutural e funcional das membranas e fertilidade. O objetivo desta revisão é discutir os pontos críticos da metodologia de extração das lipoproteínas de baixa densidade, bem como as pesquisas existentes sobre o uso de meios diluidores contendo essas lipoproteínas no congelamento de sêmen.

Palavras-chave: espermatozoides, gema do ovo, glutamina, sêmen congelado, sulfato de amônio.

Abstract

Low density lipoproteins (LDL) are considered largely responsible for the protective action of hen's egg yolk in cryopreservation of mammalian spermatozoa. The LDL extraction is an easy, fast, and efficient method, but it is important to emphasize its critical points, in order to prevent failures during the process and possible contamination of purified LDL fraction. Many studies have been evaluating the use of LDL added in seminal extenders replacing whole egg yolk. Results have shown that LDL extenders are capable to preserve spermatoc parameters such as motility, structural and functional membranes integrity, and fertility. The aim of this review is to discuss critical steps of the extraction methodology of low density lipoproteins, as well as researches developed for testing its use in frozen-thawed semen.

Keywords: ammonium sulfate, egg yolk, frozen semen, glutamine, spermatozoa.

Introdução

O efeito crioprotetor da gema do ovo tem sido primariamente atribuído às lipoproteínas de baixa densidade presentes na sua fração plasmática (Pace e Graham, 1974). Várias pesquisas vêm substituindo a gema dos meios de resfriamento/congelamento por essas lipoproteínas (Foulkes, 1977), obtendo resultados satisfatórios na manutenção da viabilidade espermática em diversas espécies domésticas (Moussa et al., 2002; Jiang et al., 2007; Al Ahmad et al., 2008; Bencharif et al., 2008; Hu et al., 2010; Akther et al., 2011; Pillet et al., 2011). A possibilidade dessa substituição é interessante para a comercialização internacional de sêmen congelado, pois pode eliminar o risco sanitário ligado à gema do ovo, que é considerada um potencial carreador de patógenos (Bencharif et al., 2012).

Além disso, outras vantagens na utilização de lipoproteínas de baixa densidade em substituição à gema são a padronização e o domínio dos componentes presentes nos meios diluidores produzidos, já que a composição proteica e lipoproteica da gema do ovo pode variar dependendo da alimentação e da genética animal, e a eliminação de componentes indesejáveis da gema, que podem reduzir a viabilidade espermática durante e após o congelamento, como é o caso das lipoproteínas de alta densidade presentes em sua porção granular (MacDonalds e Foulkes, 1981; Dong et al., 2011).

A extração é um método de isolamento da substância de interesse, a partir de uma fonte bruta, que acontece antes do início do processo de purificação. Ela remove partículas-problema, ou contaminantes, que não são compatíveis com as técnicas cromatográficas. Sua realização também permite estabelecer novos métodos de purificação, mais eficientes, econômicos e capazes de garantir alta repetibilidade e rendimento. Esse processo geralmente utiliza a técnica de precipitação por adição de sais, ou aditivos, para estabilizar o produto ou



promover a extração (Amersham Pharmacia Biotech - APB, 1999).

As técnicas existentes para extração de constituintes da gema basearam-se em metodologias usadas na separação de lipoproteínas do plasma sanguíneo. Estas são realizadas a partir de ultracentrifugações utilizando altas concentrações de sais inorgânicos, sendo as lipoproteínas purificadas por colunas cromatográficas de gel de agarose (Margolis, 1967; Carroll e Rudel, 1983; Usui et al., 2000). Nesta revisão serão enfocados pontos críticos no processo de extração das lipoproteínas de baixa densidade, bem como as pesquisas até aqui desenvolvidas no intuito de validar o uso dessas lipoproteínas em substituição à gema do ovo no congelamento de sêmen em espécies domésticas.

Métodos de extração das lipoproteínas de baixa densidade da gema do ovo de galinha

Alguns métodos de extração das lipoproteínas de baixa densidade envolvem etapas de ultracentrifugação por gradientes de densidade, que consomem longos períodos e apresentam pequena taxa de recuperação, o que os tornou desinteressantes para uso industrial (Gornall e Kuksis, 1973; Pace e Graham, 1974). Pela ultracentrifugação, Kuksis (1992) citou que são obtidas quatro frações: a de baixa densidade (70%), a solúvel em água (8%), a de baixa densidade do grânulo (4%) e a fração de lipovitelina-fosvitina (18%). A fração de baixa densidade (FBD) pode ainda ser dividida em duas, a FBD-I e a FBD-II, ambas com grande quantidade lipídica (83-89%). A fração solúvel em água apresenta três tipos de proteínas: α (28%), β (43%) e γ -livetinas (29%), enquanto a terceira fração contém dois componentes lipoproteicos, a FBD-G1 (23%) e a FBD-G2 (77%). A última fração apresenta 41% de α e 38% de β -lipovitelinas, além da fosvitina (21%; Kuksis, 1992).

Moussa et al. (2002) propuseram uma técnica rápida e fácil, obtendo-se 97% de pureza das lipoproteínas extraídas e 67% de rendimento. Nesta, inicialmente a gema tem que ser diluída em solução salina de baixa força iônica e, posteriormente, centrifugada duas vezes na velocidade de 10.000xg a 4°C, para que ocorra a separação do plasma e do grânulo da gema. Após essa etapa, o plasma da gema recuperado tem que sofrer a separação dos seus constituintes, as livetinas e as lipoproteínas de baixa densidade, por meio da técnica de precipitação (Causeret et al., 1991; Anton et al., 2003; Jolivet et al., 2006; Nilsson et al., 2006).

Pontos críticos da técnica de extração das lipoproteínas de baixa densidade

Considerando-se a metodologia descrita por Moussa et al. (2002), e também utilizada por outros autores (Anton e Gandemer, 1999; Le Denmat et al., 2000; Anton et al., 2003; Sousa et al., 2007; Neves, 2008), algumas etapas devem ser realizadas com especial atenção, a fim de se garantir o sucesso e a qualidade do produto final. Entre elas têm-se a manutenção da insolubilidade do grânulo da gema, a correção do pH do plasma e a realização da precipitação de proteínas.

A primeira etapa envolve a separação da porção granular da gema do seu plasma. A manutenção ou a solubilização dos grânulos é indesejável no processo de separação do plasma da gema para uso na criopreservação de sêmen, pois os grânulos são compostos por 70% de lipoproteínas de alta densidade, que estão relacionadas às modificações da membrana plasmática no processo de capacitação espermática. A lipoproteína de alta densidade induz a capacitação ao se ligar a moléculas de colesterol, causando seu efluxo da membrana espermática (Thérien et al., 1998). Pace e Graham (1974) obtiveram pior índice de motilidade quando espermatozoides foram congelados com a porção granular. Demianowicz e Strzezek (1995), ao avaliarem o efeito protetor das frações de lipoproteínas de alta e de baixa densidades durante o resfriamento a 4°C verificaram baixa motilidade de espermatozoides suínos diluídos na primeira fração em relação à segunda.

Essa separação é realizada por meio de centrifugação e adição de solução salina na molaridade de 0,17 (NaCl 0,17M). O importante, neste momento, é saber sobre o grau de solubilidade dessas duas frações. O grânulo, diferentemente do plasma, é altamente insolúvel, sendo sua solubilidade dependente do pH e da concentração de sal adicionado ao volume da gema (Sousa et al., 2007). Como nessa primeira etapa o objetivo é manter a insolubilidade do grânulo, isto é conseguido usando-se uma solução salina com molaridade próxima a 0,1M. Meios com alta força iônica, de molaridade superior a 0,3M, aumentam a solubilidade do grânulo, sendo este totalmente dissolvido em solução salina a 1,71M (Anton e Gandemer, 1997). Já em relação ao pH, os grânulos são insolúveis entre 4,3 e 6,5. Como o pH inicial da solução da gema está entre 5,8 e 6,4, em relação a este parâmetro, não há possibilidade de contaminação do plasma pelo grânulo (Sirvente et al., 2007).

Quanto à centrifugação, Aluko e Mine (1998) citam que este é um método seguro para separar o plasma e o grânulo da gema, quando esta é diluída em solução salina. Não ocorre sedimentação do plasma durante a centrifugação, pois este é composto por 85% de lipoproteínas de baixa densidade, com densidade de 0,982 g/mL (Sousa et al., 2007).

Outro ponto crítico do processo é a correção do pH do plasma da gema para a realização da técnica de precipitação. Após a centrifugação, o plasma recuperado tem pH inferior a 6,4, e este deve ser corrigido para 8,7. Isto proporciona condições isoelétricas que promovam a precipitação de proteínas de interesse do plasma, que, no caso dessa terceira etapa, são as livetinas (Moussa et al., 2002).



A precipitação de proteínas pode ser feita pela adição de sais neutros, como o sulfato de amônio. Este é o mais utilizado, por ser barato e suficientemente solúvel, sendo sua concentração mensurada a partir do seu grau de saturação (Harris, 1992). No caso da extração das lipoproteínas de baixa densidade, Sousa et al. (2007) observaram menor solubilidade do plasma da gema quando adicionada solução de sulfato de amônio ((NH₄)₂SO₄), o que permitiu a separação dos seus constituintes por precipitação.

O ponto crítico dessa terceira etapa se refere à adição do sulfato de amônio à solução do plasma, que pode ser feita utilizando-se esse sal na forma granulada ou diluída. Ambas as formas devem ser adicionadas lentamente, para se evitar a formação de grumos do sal ou a precipitação de proteínas indesejadas (Harris, 1992). No entanto, o risco de uma adição rápida é maior quando se adiciona o sal na forma granulada, ao compará-lo com a forma diluída. Isto porque a adição dos grânulos é feita manualmente, podendo levar ao cansaço do laboratorista quando a quantidade a ser adicionada é grande. Consequentemente, ocorrerá um comprometimento da velocidade ideal de adição. Para evitar esse problema, Neves (2008) utilizou a solução saturada de sulfato de amônio, que, com o auxílio de uma bureta, permitiu uma adição lenta por gotejamento. Tal procedimento se mostrou eficiente na precipitação dos contaminantes, sem comprometer a velocidade e a qualidade das lipoproteínas obtidas ao final da extração, analisadas pelo perfil eletroforético em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE; Neves, 2008).

Congelamento de sêmen utilizando as lipoproteínas de baixa densidade em substituição à gema do ovo

Os primeiros testes utilizando a gema fracionada mostraram que a porção rica em lipoproteínas de baixa densidade era mais eficiente na preservação espermática que porções ricas em outras proteínas, como livetinas, fosvitinas e lipoproteínas de alta densidade. A partir daí, várias hipóteses foram formuladas com a finalidade de tentar esclarecer o possível mecanismo de ação das lipoproteínas de baixa densidade (Pace e Graham, 1974; Foulkes, 1977; Bergeron et al., 2004; Bergeron e Manjunath, 2006). Simultaneamente, houve a preocupação em se determinar a concentração ideal de lipoproteínas para adição no meio diluidor, a fim de se garantir o sucesso da técnica de congelamento e descongelamento do sêmen.

Moussa et al. (2002) obtiveram melhores resultados na preservação da motilidade de espermatozoides bovinos pós-descongelamento nas concentrações entre 5 e 10% (p/v), sendo a de 8% mais apropriada. Eles perceberam que concentrações superiores a 10% podem ser danosas ao espermatozoide, provavelmente devido ao aumento da pressão osmótica. Trabalhos realizados em outras espécies verificaram que a viabilidade espermática foi mais bem preservada em meios de congelamento contendo 9% (p/v) para suínos (Jiang et al., 2007), 6% para caninos (Bencharif et al., 2008), 10% para bubalinos (Akther et al., 2011) e 8% (p/v) para ovinos (Moustacas et al., 2011) e caprinos (Al Ahmad et al., 2008). Em sêmen resfriado, a substituição da gema de ovo por lipoproteínas também foi eficaz na manutenção da motilidade espermática e na integridade, estrutural e funcional, de membranas espermáticas em cães (Varela Junior et al., 2009) e touros (Vera-Munoz et al., 2011), nas concentrações de 6, 8 e 10% (v/v) e 8% (p/v), respectivamente.

Amirat et al. (2004) avaliaram a taxa de fertilidade *in vitro* do sêmen bovino congelado, ao compararem o meio Tris-cítrico com 8% (p/v) de lipoproteínas de baixa densidade e o meio comercial Optidyl[®], que contém 20% de gema de ovo. O meio contendo as lipoproteínas apresentou maior taxa de clivagem embrionária que o meio controle e não alterou o desenvolvimento embrionário, apresentando taxa de blastocistos semelhante ao controle. Já em testes de fertilidade *in vivo*, Bencharif et al. (2008) obtiveram ninhadas das seis cadelas inseminadas com sêmen congelado em diluidores contendo lipoproteínas (6% - 16,5 g), enquanto Amirat-Briand et al. (2010) obtiveram 59,2% de prenhez positiva em vacas primíparas inseminadas com sêmen diluído em meio contendo lipoproteínas (8% p/v) em comparação aos 65,3% obtidos com sêmen congelado em meio diluidor contendo gema do ovo (20% v/v).

Atualmente, outros estudos têm sido desenvolvidos no intuito de maximizar o efeito crioprotetor das lipoproteínas de baixa densidade, adicionando-se Equex ou glutamina aos meios de congelamento, ou testá-las na presença de crioprotetores alternativos ao glicerol. Bencharif et al. (2010b) verificaram que não houve diferença na manutenção da motilidade e da integridade de membranas em espermatozoides caninos utilizando-se meios contendo 6% (16,5 g) de lipoproteínas ou meios contendo Equex, mas que ambos foram superiores ao meio diluidor Tris-gema. Já estudos que associaram a glutamina às lipoproteínas de baixa densidade obtiveram uma melhora na motilidade espermática em cães (6% + 20 mmol de glutamina; Bencharif et al., 2010a) e em touros (8% + 10 mM de glutamina; Amirat-Briand et al., 2009). Quanto ao uso de crioprotetores, Neves et al. (2009) verificaram que o etilenoglicol pode substituir o glicerol na preservação da motilidade e da integridade, estrutural e funcional, das membranas em espermatozoides caninos, diferentemente do observado para o dimetilformamida, na presença de baixa concentração de lipoproteínas (1% p/v).

Considerações finais

Os estudos quanto ao uso das lipoproteínas de baixa densidade têm mostrado que estas são capazes de preservar a motilidade espermática e a integridade de suas membranas, além da capacidade fecundante, em



substituição à gema do ovo. Esse sucesso é alcançado utilizando-se concentrações espécie-específicas, com possível adição de substâncias complementares ao meio diluidor. Sua metodologia de extração é fácil, porém deve-se atentar para detalhes importantes como o preparo correto das soluções quanto ao pH e à molaridade, bem como assegurar a precipitação de proteínas para que as lipoproteínas de baixa densidade, obtidas ao final, apresentem alto grau de pureza.

Referências

- Akhter S, Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SMH, Khalid M, Ullah N.** Effect of low density lipoproteins in extender on freezability and fertility of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull semen. *Theriogenology*, v.76, p.759-764, 2011.
- Al Ahmad MZA, Chatagnon G, Amirat-Briand L, Moussa M, Tainturier D, Anton M, Fieni F.** Use of glutamine and low density lipoproteins isolated from egg yolk to improve buck semen freezing. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.429-436, 2008.
- Aluko RE, Mine Y.** Characterization of oil-in-water emulsions stabilized by hen's egg yolk granule. *Food Hydrocolloids*, v.12, p.203-210, 1998.
- Amersham Pharmacia Biotech.** Protein Purification Handbook. Sweden: Amersham Pharmacia Biotech, 1999. 103p.
- Amirat L, Tainturier D, Jeanneau L, Thorin C, Gérard O, Courtens JL, Anton M.** Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with Optidyl®, a commercial egg yolk extender. *Theriogenology*, v.61, p.895-907, 2004.
- Amirat-Briand L, Bencharif D, Vera-Munoz O, Bel Hadj Ali H, Destrumelle S, Desherces S, Schmidt E, Anton M, Tainturier D.** Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoprotein) extender: preliminary results. *Theriogenology*, v.71, p.1209-1214, 2009.
- Amirat-Briand L, Bencharif D, Vera-Munoz O, Pineau S, Thorin C, Destrumelle S, Desherces S, Anton M, Jouan M, Schmitt E, Tainturier D.** In vivo fertility of bull semen following cryopreservation with an LDL (low density lipoprotein) extender: preliminary results of artificial inseminations. *Anim Reprod Sci*, v.122, p.282-287, 2010.
- 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, Gandemer G.** Effect of pH on interface composition and on quality of oil-water emulsions made with hen egg yolk. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, v.12, p.351-358, 1999.
- 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.
- Bencharif D, Amirat L, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois M-L, Barrière P, Larrat M, Tainturier D.** The advantages of LDL (Low Density Lipoproteins) in the cryopreservation of canine semen. *Theriogenology*, v.70, p.1478-1488, 2008.
- Bencharif D, Amirat L, Pascal O, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois M-L, Barrière P, Larrat M, Tainturier D.** The advantages of combining Low-density lipoproteins with glutamine for cryopreservation of canine semen. *Reprod Domest Anim*, v.45, p.189-200, 2010a.
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois M-L, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D.** Freezing canine sperm: Comparison of semen extenders containing Equex and LDL (Low Density Lipoproteins). *Anim Reprod Sci*, v.119, p.305-313, 2010b.
- Bencharif D, Amirat-Briand L, Garand A, Anton M, Schmitt E, Desherces S, Delhomme G, Langlois M-L, Barrière P, Destrumelle S, Vera-Munoz O, Tainturier D.** The advantages of using a combination of LDL and glutamine in comparison with TRIS egg yolk and Equex STAMP extenders in the cryopreservation of canine semen. *Res Vet Sci*, v.93, p.440-447, 2012.
- 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.
- Carroll RM, Rudel LL.** Lipoprotein separation and low density lipoprotein molecular weight determination using high performance gel-filtration chromatography. *J Lipid Res*, v.24, p.200-207, 1983.
- Causeret D, Matringe E, Lorient D.** Ionic strength and pH effects on composition and microstructure of yolk granules. *J Food Sci*, v.56, p.1532-1536, 1991.
- Demianowicz W, Strzezek J.** The effect of lipoprotein fraction from egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod Domest Anim*, v.31, p.279-280, 1995.



- Dong Q-X, Rodenburg SE, Hill D, VandeVoort CA.** The role of low-density lipoprotein (LDL) and high-density lipoprotein (HDL) in comparison with whole egg yolk for sperm cryopreservation in rhesus monkeys. *Asian J Androl*, v.13, p.459-464, 2011.
- 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.
- Gornall DA, Kuksis A.** Alterations in lipid composition of plasma lipoproteins during deposition of egg yolk. *J Lipid Res*, v. 14, p. 197-205, 1973.
- Harris ELV.** Concentration of the extract. In: Harris ELV, Angal S (Ed.). Protein purification methods: a practical approach. New York: IRL, 1992. p.125-161.
- Hu J-H, Li Q-W, Zan L-S, Jiang Z-L, An J-H, Wang L-Q, Jia Y-H.** The cryoprotective effect of low-density lipoproteins in extenders on bull spermatozoa following freezing-thawing. *Anim Reprod Sci*, v.117, p.11-17, 2010.
- Jiang Z, LI Q, Hu J, Li W, Zhao H, Zhang S.** Improvement of the quality of boar cryopreservation semen by supplementing with low-density lipoprotein in diluents. *Cryobiology*, v.54, p.301-304, 2007.
- 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.
- Kuksis A.** Yolk lipids. *Biochim Biophys Acta*, v.1124, p.205-222, 1992.
- Le Denmat M, Anton M, Beaumal V.** Characterisation of emulsion properties and of interface composition in O/W emulsions prepared with hen egg yolk, plasma and granules. *Food Hydrocolloids*, v.14, p.539-549, 2000.
- 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.
- Margolis S.** Separation and size determination of human serum lipoproteins by agarose gel filtration. *J Lipid Res*, v.8, p.501-507, 1967.
- 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.
- Moustacas VS, Zaffalon FG, Lagares MA, Loaiza-Eccheverri AM, Varago FC, Neves MM, Heneine LGD, Arruda RP, Henry M.** Natural, but not lyophilized, low density lipoproteins were an acceptable alternative to egg yolk for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*, v.75, p.300-307, 2011.
- 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.
- Neves MM, Henry M, Heneine LGD.** Effects of the association of low density lipoproteins to several cryoprotectants on post-thaw canine sperm viability. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 18, 2009, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte: CBRA, 2009. p.457. Resumo. CD-ROM.
- Nilsson L, Osmark P, Fernandez C, Andersson M, Bergenstahl B.** Competitive adsorption of water soluble plasma proteins from egg yolk at the oil/water interface. *J Agric Food Chem*, v.54, p.6881-6887, 2006.
- Pace MM, Graham EF.** Components in egg yolk which protect bovine spermatozoa during freezing. *J Anim Sci*, v.39, p.1144-1149, 1974.
- Pillet E, Duchamp G, Batellier F, Beaumal V, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Magistrini M.** Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, v.75, p.105-114, 2011.
- 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. *LWT - 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.
- Usui S, Nakamura M, Jitsukata K, Nara M, Hosaki S, Okazaki M.** Assessment of between-instrument variations in a HPLC method for serum lipoproteins and its traceability to reference methods for total cholesterol and HDL-Cholesterol. *Clin Chem*, v.46, p.63-72, 2000.
- Varela Junior AS, Corcini CD, Ulguim RR, Alvarenga MVF, Bianchi I, Corrêa MN, Lucia Jr T, Deschamps JC.** Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. *Anim Reprod Sci*, v.115, p.323-327, 2009.
- Vera-Munoz O, Amirat-Briand L, Bencharif D, Anton M, Desherces S, Schmitt E, Thorin C, Tainturier D.** Effect of low-density lipoproteins, spermatozoa concentration and glycerol on functional and motility parameters of bull spermatozoa during storage at 4°C. *Asian J Androl*, v.13, p.281-286, 2011.