



Utilização da lipoproteína de baixa densidade, em diferentes concentrações, em meio diluidor para criopreservação do sêmen ovino

[Use of low density lipoprotein in different concentrations in diluent medium for cryopreservation of ovine semen]

A.S. Lima¹, R.F. Bittencourt^{2*}, A.L. Ribeiro Filho², M.V.G. Loiola²,
G.F.O. Menezes³, R.O. Barreto¹, I.C. Vasconcelos¹, C.C. Silva¹,
E.O. Jesus⁴, P.P.N. Snoeck⁵

¹Programa de graduação - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia - Salvador, BA

²Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia - Salvador, BA

³Programa de pós-graduação - Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal da Bahia - Salvador, BA

⁴In Vitro Brasil - Mogi Mirim, SP

⁵Universidade Estadual de Santa Cruz - Ilhéus, BA

RESUMO

A utilização da gema de ovo dificulta a padronização de meios diluidores e apresenta riscos biológicos. Assim, este estudo avaliou diferentes concentrações da lipoproteína de baixa densidade (LDL), em substituição à gema de ovo, para a confecção de diluentes para criopreservação espermática em ovinos. Foram utilizados um diluidor controle (CTR= 20% de gema de ovo) e cinco tratamentos, substituindo-se a gema pelas diferentes proporções de LDL (T1=6%; T2=8%; T3=12%; T4=16%; T5=20%), todos à base de TRIS-glicerol. Para o estudo, utilizaram-se dois ejaculados, de seis reprodutores da raça Santa Inês. Sessenta dias após a criopreservação, as amostras foram descongeladas e avaliadas subjetivamente quanto à motilidade total (MT, %) e progressiva (MP, %), ao vigor (1-5) e à integridade funcional (choque hiposmótico com água destilada, %) e estrutural (corante supravital eosina, %) das membranas espermáticas. As avaliações de vigor e funcionalidade de membrana não diferiram ($P>0,05$) entre os grupos. Entretanto, os grupos T4 ($P<0,01$) e T5 ($P<0,05$) foram superiores ao CTR para os parâmetros MT, MP e integridade estrutural de membrana, o que confirma que as LDLs podem ser alternativas eficientes para substituição da gema de ovo em diluidores para criopreservação de sêmen ovino.

Palavras-chave: LDL, espermatozoide, *Ovis aires*

ABSTRACT

The use of egg yolk makes it difficult to standardize extenders and presents biological hazards. Thus, this study evaluated different concentrations of low-density lipoprotein (LDL) to replace yolk extenders for production of sperm for cryopreservation in ovine. A control extender was used (CTR= 20% yolk) and five treatments, replacing the yolk by different ratios of LDL (T1= 6%; T2= 8%, T3= 12%; T4= 16%; T5= 20%) all based on TRIS-glycerol. For the study, two ejaculates from six Santa Ines breeding were used. Sixty days after cryopreservation, the samples were thawed and evaluated for total motility (MT, %) and progressive motility (MP, %), vigor (1-5) and the functional integrity (hyposmotic shock with distilled water, %) and structural (supravital dye eosin, %) of the sperm membranes. The evaluations of strength and membrane functionality didn't differ ($P> 0.05$) between groups. However, T4 ($P< 0.01$) and T5 ($P< 0.05$) groups were superior to the CTR for the MT, MP, and membrane structural integrity parameters, which confirms that LDLs can be efficient alternatives for yolk replacement in extenders for cryopreservation of ovine semen.

Keywords: LDL, sperm *Ovis aires*

Recebido em 25 de julho de 2018

Aceito em 24 de janeiro de 2019

*Autor para correspondência (corresponding author)

E-mail: rfbvet1@gmail.com

A.S. Lima
<https://orcid.org/0000-0003-0712-1713>
R.F. Bittencourt
<https://orcid.org/0000-0002-0341-2073>
A.L. Ribeiro Filho
<https://orcid.org/0000-0003-3108-4684>
G.F.O. Menezes
<https://orcid.org/0000-0001-8670-7952>
R.O. Barreto
<https://orcid.org/0000-0003-3042-2493>
I.C. Vasconcelos
<https://orcid.org/0000-0001-6449-6314>
C.C. Silva
<https://orcid.org/0000-0001-9523-5790>
E.O. Jesus
<https://orcid.org/0000-0002-6551-5166>
P.P.N. Snoeck
<https://orcid.org/0000-0003-4445-8630>

INTRODUÇÃO

A criopreservação espermática é uma ferramenta importante para o melhoramento genético dos ovinos devido à possibilidade de preservar material genético superior por tempo indeterminado (Leboeuf *et al.*, 2000), além de reduzir custos e riscos relacionados à aquisição do reprodutor, facilitar o transporte das doses de sêmen para qualquer região e aumentar o número de progênes por macho, quando associado à técnica de inseminação artificial (IA), o que favorece a disseminação de material genético de qualidade superior em vários locais ao mesmo tempo (Leboeuf *et al.*, 1998). Entretanto, após o processo de congelamento e descongelamento do sêmen, uma grande parte dos espermatozoides se torna inviável (Bailey *et al.*, 2000).

A fim de obter um maior número de células viáveis após o processo de congelamento e descongelamento do sêmen, diversos fatores devem ser observados; destaca-se, entre eles, o tipo, a composição do diluente e a concentração do crioprotetor espermático (Castelo *et al.*, 2008; Salamon e Maxwell, 1995). Com isso, diferentes diluidores, a maioria à base de gema de ovo integral, têm sido testados com o intuito de minimizar esses efeitos deletérios (Salamon e Maxwell, 2000). Estudos têm demonstrado que, apesar dos crescentes avanços no processo de criopreservação espermática, a maioria dos protocolos vigentes propõem redução de taxas – entre 50 e 60% – de sobrevivência espermática pós-descongelamento (Celeghini *et al.*, 2008). Outro aspecto importante é que existem diversas restrições ao uso da gema de ovo como componente de diluidores para congelamento de sêmen de pequenos ruminantes, entre eles, o risco sanitário de contaminação por patógenos nas doses de sêmen (Moussa *et al.*, 2002), assim como a presença da porção granular que interfere na visualização microscópica de gametas, além da ação de alguns constituintes prejudiciais à motilidade e ao metabolismo espermático (Pace e Graham, 1974; Vera-Munhoz *et al.*, 2009).

A utilização da lipoproteína de baixa densidade (LDL) tem sido uma alternativa promissora em substituição à gema de ovo na técnica de criopreservação espermática (Pillet *et al.*, 2011), pois é a fração da gema de ovo que protege os espermatozoides contra os efeitos deletérios do processo de criopreservação e age apresentando

um ambiente favorável à sobrevivência espermática (Amirat-Briand *et al.*, 2010; Varela Junior *et al.*, 2009). A utilização das LDLs nos diluidores seminais tem se mostrado eficiente para manutenção dos parâmetros espermáticos *in vitro* e mantido ou melhorado os índices de fertilidade em comparação ao sêmen congelado em meios diluidores convencionais (Moustacas *et al.*, 2011). Contudo, faz-se necessária a realização de mais trabalhos para a padronização da melhor concentração de LDL a ser incorporada ao diluidor à base desse constituinte na espécie ovina (Moussa *et al.*, 2002). Com isso, este estudo teve como objetivo avaliar, em um único estudo, as principais concentrações de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), testadas anteriormente em diferentes trabalhos, para a substituição da gema de ovo em diluidores para criopreservação espermática em ovinos.

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Ceua), licença 41/2014. Para o estudo, foram utilizados seis ovinos da raça Santa Inês, com idades variando entre 10 e 36 meses, todos submetidos à vermifugação e à nutrição balanceada, composta por ração própria para ovinos, além de fornecimento de feno, sal mineral e água *ad libitum*. Trinta dias antes do início das congelamentos de sêmen, cada reprodutor foi submetido a duas coletas de sêmen, por meio de vagina artificial, em dias alternados. Aqueles que possuíam os parâmetros preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução (Manual..., 2013) foram incluídos no trabalho.

Posteriormente à coleta, os ejaculados foram avaliados quanto às características físicas, tais como o volume, a cor, o aspecto e o odor, bem como quanto às características microscópicas, por meio de turbilhonamento, motilidade total e progressiva, vigor espermático e viabilidade funcional e estrutural de membrana, pelo choque hiposmótico com água destilada e corante supravital eosina, respectivamente (Manual..., 2013; Menezes *et al.*, 2013; Barth e Oko, 1989).

A fim de avaliar a melhor concentração das LDLs, foram formulados cinco diluidores com diferentes concentrações de LDL, além do diluidor controle (Bittencourt *et al.*, 2008) à base de TRIS-gema de ovo (CTR- 20% de gema de ovo). Compuseram o estudo o tratamento 1 (T1-

6% de LDL), o tratamento 2 (T2-8% de LDL), o tratamento 3 (T3-12% de LDL), o tratamento 4 (T4-16% de LDL) e o tratamento 5 (T5-20% de LDL). Para a composição do meio base, foi utilizada a solução TRIS-gema de ovo e glicerol (Bittencourt *et al.*, 2014), substituindo-se totalmente a gema de ovo por LDL para os diferentes tratamentos.

Posteriormente às análises iniciais e à concentração espermática, um total de 1mL dos seis diluidores foi adicionado lentamente a microtubos aquecidos, cada um contendo 320×10^6 espermatozoides com motilidade progressiva. Isso compôs quatro doses inseminantes com 80×10^6 de espermatozoides com motilidade progressiva/0,25mL por grupo experimental. Na sequência, as amostras foram submetidas ao resfriamento a 5°C (0,47°C/min), tempo de equilíbrio (total de duas horas), e, então, congeladas em nitrogênio líquido (Bittencourt *et al.*, 2008).

As descongelações das amostras foram realizadas ao menos 60 dias depois, incubando-se as palhetas em banho-maria a 37°C, por 30 segundos (Lucidi *et al.*, 2001), e, em seguida, foram submetidas à análise subjetiva, conforme preconizado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Manual..., 2013), de motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %) e vigor espermático (VIG, 1-5). A avaliação da integridade funcional (HOST, %) da membrana plasmática foi realizada pelo choque osmótico, com água destilada (Menezes *et al.*, 2013), e, quanto à integridade estrutural (SV, %), foi utilizado o corante supravital eosina (Barth e Oko, 1989). Todas as análises de todos os diluidores testados foram realizadas pelo mesmo avaliador, que recebia as amostras identificadas por números aleatórios. Dessa forma, apenas o auxiliar responsável pelas anotações tinha conhecimento de que grupo experimental se tratava.

Para o delineamento estatístico, os ejaculados foram considerados repetições e os diferentes meios diluidores foram considerados tratamentos. As médias e o desvio-padrão das características de interesse do estudo foram obtidos por meio de análise descritiva. Os resultados foram submetidos ao pacote estatístico SAS, versão 9.0 (2002). Como todas as amostras apresentaram padrão não normal de distribuição (Shapiro-Wilk), procedeu-se ao teste de Kruskal-Wallis para estudo de eventuais diferenças das características espermáticas entre os diluidores testados. Quando confirmada a diferença entre os grupos, o parâmetro espermático foi comparado entre os grupos, individualmente, com o teste de Bonferroni. Todas as análises consideraram o nível de significância de 5%.

RESULTADOS

Como pode ser observado na Fig. 1, as porcentagens de MT nos tratamentos T4 (53%) e T5 (50%) foram significativamente maiores ($P < 0,05$) quando comparadas à do tratamento CTR (31%). Na comparação entre grupos com LDL, a MT do grupo T4 (53%) foi superior ($P < 0,05$) às obtidas no T1 (34%), T2 (34%) e T3 (41%). Em relação à MP, os grupos T4 ($P < 0,01$) e T5 ($P < 0,05$) foram superiores ao grupo CTR, apresentando percentuais de 45% e 43% para os grupos T4 e T5, respectivamente, *versus* 24% para o grupo CTR, sem diferença entre os demais grupos estudados.

Na avaliação da SV, o valor obtido para o grupo T5 (24%) foi superior ($P < 0,05$) aos grupos CTR (16%), T1 (12%) e T2 (13%); no entanto, não diferiu ($P > 0,05$) dos encontrados para T3 (18%) e T4 (19%). Para os parâmetros de VIG e HOST, entretanto, não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os grupos experimentais (Tab. 1).

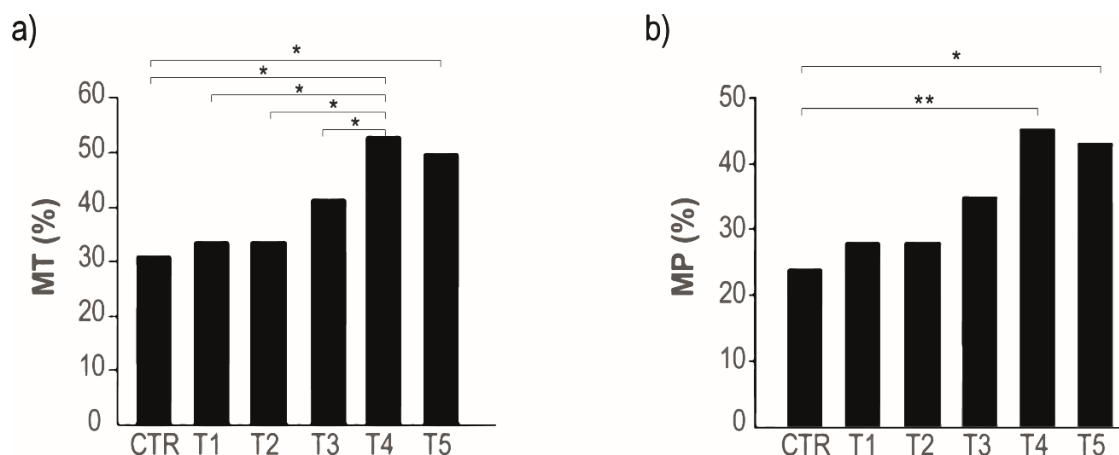


Figura 1. Comparação dos percentuais médios obtidos para: (a) motilidade espermática total (MT) e (b) motilidade espermática progressiva (MP) pós-descongelamento, de sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês, entre os diferentes tratamentos experimentais. CTR – tratamento controle com 20% de gema de ovo; T1 – tratamento com 6% de LDL; T2 – tratamento com 8% de LDL; T3 – tratamento com 12% de LDL; T4 – tratamento com 16% de LDL; e T5 – tratamento com 20% de LDL. * Representa diferença significativa com $P < 0,05$. ** Representa diferença significativa com $P < 0,01$. Foram empregados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Bonferroni.

Tabela 1. Análise do vigor espermático (VIG), dos percentuais de células com integridade estrutural da membrana plasmática avaliada pelo corante eosina (SV) e da integridade funcional da membrana plasmática avaliada pelo choque osmótico (HOST) pós-descongelamento, de sêmen criopreservado de ovinos Santa Inês, entre os diferentes tratamentos experimentais. Os valores expressam as médias de cada tratamento

Parâmetros	Tratamentos					
	CTR	T1	T2	T3	T4	T5
VIG (1-5)	3,15	3,4	3,4	3,4	3,6	3,6
SV (%)	16 ^b	12 ^b	13 ^b	18 ^{ab}	19 ^{ab}	24 ^a
HOST (%)	11	10	10	5	12	7

CTR – tratamento controle com 20% de gema de ovo; T1 – tratamento com 6% de LDL; T2 – tratamento com 8% de LDL; T3 – tratamento com 12% de LDL; T4 – tratamento com 16% de LDL; e T5 – tratamento com 20% de LDL. ^{a, b} Letras distintas na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos experimentais ($P < 0,05$). Foram empregados os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Bonferroni.

DISCUSSÃO

Após a criopreservação, a qualidade do sêmen descongelado é reduzida em várias espécies, sendo associada principalmente aos estresses térmico, osmótico e oxidativo (Martinez-Páramo *et al.*, 2012). O Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Manual..., 2013) preconiza, para ovinos, valores $\geq 30\%$ para o parâmetro MT, após descongelamento. Neste estudo, a média para MT (40,5%) foi superior à recomendada pelo CBRA. Conclui-se que todos os diluidores estudados, com gema de ovo integral ou LDL, proporcionaram índices adequados de manutenção da MT pós-descongelamento.

Lipoproteínas de baixa densidade é a fração da gema de ovo responsável pelo seu efeito crioprotetor, pois impede o efluxo de fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática da célula espermática, ao se aderir à membrana (Majunath *et al.*, 2002; Moussa *et al.*, 2002; Amirat Briand *et al.*, 2004), além de promover a incorporação de fosfolipídios e colesterol na membrana espermática (Graham e Foote, 1987; Bergeron *et al.*, 2004), melhorando, assim, a resistência espermática ao choque térmico, o que favorece o aumento nos índices de motilidade, integridade acrossomal e integridade de membrana plasmática (Graham e Foote, 1987; Demaniowicz e Strzerek, 1996; Moussa *et al.*, 2002).

As variações observadas para os parâmetros de MT entre os grupos estudados justificam-se pelas diferentes concentrações de LDL utilizadas, as quais proporcionaram diferentes níveis de proteção espermática. De uma forma geral, todos os diluidores que continham LDL promoveram médias de MT semelhantes ou superiores ao diluidor controle com gema de ovo. Essa superioridade ($P < 0,05$), verificada por diluidores que sofreram substituição completa da gema de ovo integral por percentuais mais altos de LDL, ainda não havia sido relatada, mesmo em estudos que empregaram concentrações de LDL semelhantes às dos diluidores deste estudo, o T4 (16%) e o T5 (20%) (Moustacas *et al.*, 2011). Já quanto aos diluidores com menores percentuais de LDL (T1-6%, T2-8%), apesar de não apresentarem índices superiores de manutenção da MT pós-descongelamento, quando comparados ao diluidor controle com gema de ovo, suas médias não diferiram ($P > 0,05$). Relato semelhante foi descrito por Silva *et al.* (2014), que compararam diluidores com 4 e 8% de LDL e grupo controle com 15% de gema de ovo integral e não observaram diferença ($P > 0,05$) na MT.

Outra possibilidade que contribuiu para a maior eficiência dos diluidores T4 e T5 para manutenção da MT pós-descongelamento, em relação ao CTR, é que, nos grupos com LDL, estão ausentes constituintes, como as lipoproteínas de alta densidade (HDL), da gema de ovo, as quais interferem na cinética e no metabolismo da célula espermática (Vera-Munhoz *et al.*, 2009).

Estudo de Moustacas *et al.* (2011), com ovinos, avaliaram a utilização da LDL como alternativa à gema de ovo integral (16%), na composição de diluidores seminais, e, diferentemente do presente estudo, não constataram diferença significativa para os parâmetros de motilidade total e progressiva pós-descongelamento nos meios à base de gema de ovo ou LDL. Já Moussa *et al.* (2002), em estudo com bovinos, verificaram que a MT pós-descongelamento foi superior quando se utilizou, para a criopreservação espermática, diluidor com percentual intermediário de LDL (8%), em comparação com percentuais superiores (9 e 10%), o que diferiu dos resultados obtidos no presente estudo, que apresentou melhores ($P < 0,05$) índices de manutenção da MT com percentuais mais

elevados de LDL (16 e 20%). Essas discordâncias entre os trabalhos podem ser explicadas por inúmeros fatores que podem interferir no resultado, como as diferenças na composição dos diluidores empregados, bem como de espécie, da variabilidade individual e dos distintos protocolos de processamento do sêmen e descongelamento.

Assim como verificado para a motilidade espermática, os resultados obtidos pós-descongelamento para o vigor espermático, em todos os diluidores estudados, mantiveram-se acima dos padrões exigidos pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Manual..., 2013), que estabelece que o VIG seja $\geq 3,0$ (1-5). Esse achado reforça a observação feita anteriormente de que os diluidores com LDL foram eficientes para a manutenção dos parâmetros subjetivos de cinética espermática. Embora não tenha ocorrido, um menor VIG para os espermatozoides criopreservados com gema de ovo era esperado, já que esse componente na forma integral dificulta a movimentação da célula espermática, devido à presença de HDL, que causa redução de cinética espermática (Demaniowicz e Strzezek, 1996).

Embora a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides não tenha sofrido influência dos diluidores testados, o mesmo fato não aconteceu com a integridade estrutural da membrana plasmática, cujo maior ($P < 0,05$) percentual de espermatozoides com membrana íntegra (SV) foi verificado para o grupo com maior percentual de LDL (T5-20%), quando comparado aos grupos com menores percentuais (T1-6% e T2-8%). Esse resultado, possivelmente, ocorreu pela maior estabilidade conferida à membrana plasmática com a maior oferta de moléculas de LDL, que, ao se romperem durante a criopreservação, forneceram quantidades adequadas de fosfolipídios e colesterol, os quais se incorporam à membrana plasmática do espermatozoide, durante o processo de criopreservação, além de inibirem a toxicidade de algumas proteínas do plasma seminal, que acabam ligando-as às LDLs (Moussa *et al.*, 2002).

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que as lipoproteínas, nas diferentes concentrações

estudadas, podem substituir a gema de ovo integral no diluidor de congelação do sêmen ovino, com índices de manutenção dos parâmetros espermáticos superiores nos tratamentos T4-16% LDL e T5-20% LDL.

REFERÊNCIAS

- AMIRAT-BRIAND, L.; BENCHARIF, D.; VERA-MUNOZ, O. *et al.* 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.
- AMIRAT-BRIAND, L.; TAINURIER, D.; JEANNEAU, L. *et al.* 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.
- BAILEY, J.L.; BLODEAU, J.F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon minireview. *J. Androl.*, v.21, p.1-7, 2000.
- BARTH, A.D.; OKO, R.J. *Abnormal morphology of bovine spermatozoa*. Ames, Iowa: Iowa State University Press, 1989. p.285.
- BERGERON, A.; CRÊTE, M.H.; BRINDLE, Y.; MANJUNATH, P. Low-density lipoprotein fraction from hen's egg yolk decreases the binding of the major protein of bovine seminal plasma to sperm and prevents lipid efflux from the sperm membrane. *Biol. Reprod.*, v.70, 708-717, 2004.
- BITTENCOURT, R.F.; OBA, E.; RIBEIRO FILHO, A.L. *et al.* Trehalose and a calcium chelator for ram semen cryopreservation. *Arch. Vet. Sci.*, v.19, p.69-77, 2014.
- BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; CHALHOUB, M. *et al.* Efeito de um quelante de cálcio, um detergente e da lecitina de soja sobre a qualidade do sêmen caprino congelado-descongelado. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.45, p.305-312, 2008.
- CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos. *Acta Vet. Bras.*, v.2, p.67-75, 2008.
- CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C. *et al.* Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Anim. Reprod. Sci.*, v.104, p.119-131, 2008.
- DEMANIOWICZ, W.; STRZEZEK, J. The effect of lipoprotein fraction of egg yolk on some of the biological properties of boar spermatozoa during storage of the semen in liquid state. *Reprod. Dom. Anim.*, v.31, p.279-280, 1996.
- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H. 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.
- LEBOEUF, B.; MANFREDIB, E.; BOUEC, P. *et al.* Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest. Prod. Sci.*, v.55, p.193-203, 1998.
- LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.113-141, 2000.
- LUCIDI, P.; BARBONI, B.; MATTIOLI, M. Ram-induced ovulation to improve artificial insemination efficiency with frozen semen in sheep. *Theriogenology*, v.55, p.1797-1805, 2001.
- 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.
- MANUAL para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 37p.
- MARTINEZ-PÁRAMO, S.; DIOGO, P.; DINIS, M.T. *et al.* Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved sea bass sperm. *Theriogenology*, v.77, p.1129-1136, 2012.
- MENEZES, G.F.O.; BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L. *et al.* Utilização do choque osmótico na avaliação da viabilidade de sêmen criopreservado de ovinos. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, v.50, p.396-405, 2013.

- MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A. *et al.* 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, V.S.; ZAFFALON, F.G.; LAGARES, M.A. *et al.* 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.
- PACE, M.M.; GRAHAM, E.F. 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. *et al.* Egg yolk plasma can replace egg yolk in stallion freezing extenders. *Theriogenology*, v.75, p.105-114, 2011.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M. Storage of ram semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.77-111, 2000.
- SALAMON, S.; MAXWELL, W.M.C. Frozen storage of ram semen. I. Processing, freezing, thawing and fertility after cervical insemination. *Anim. Reprod. Sci.*, v.37, p.185-249, 1995.
- SAS user guide. Version 9.0. Cary: SAS, 2002.
- SILVA, M.C.; MOURA, L.C.O.; MELO, M.I.V. *et al.* Prolonged post cooling but not precooling equilibrium length improves the viability of ram sperm cryopreserved in an extender containing low-density lipoproteins. *Small Ruminant Res.*, v.119, p.88-95, 2014.
- VARELA JUNIOR, A.S.; CORCINI, C.D.; ULGUIM, R.R. *et al.* 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.; DIAZ, T. *et al.* Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low-density lipoproteins (LDL) extender: comparison to triladyl and bioxcell. *Theriogenology*, v.71, p.895-900, 2009.