

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



Dissertação

**Nanopartículas de lipoproteína de baixa densidade na criopreservação do  
sêmen canino**

**Edenara Anastácio da Silva**

Pelotas, 2019

**Edenara Anastácio da Silva**

**Nanopartículas de lipoproteína de baixa densidade na criopreservação do  
sêmen canino**

Dissertação 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 Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Antonio Sergio Varela Junior

Coorientadora: Dra. Carine Dahl Corcini

Pelotas, 2019

S586n Silva, Edenara Anastácio da

Nanopartículas de lipoproteína de baixa densidade na criopreservação do sêmen canino / Edenara Anastácio da Silva ; Antonio Sergio Varela Junior, orientador ; Carine Dahl Corcini, coorientadora. — Pelotas, 2019.

44 f.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. Lipoproteína de baixa densidade. 2. Nanopartículas. 3. Diluente seminal. 4. Criopreservação. 5. Plasma de gema de ovo. I. Varela Junior, Antonio Sergio, orient. II. Corcini, Carine Dahl, coorient. III. Título.

CDD : 636.70824

Edenara Anastácio da Silva

Nanopartículas de lipoproteína de baixa densidade na criopreservação do sêmen  
canino

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

Data da Defesa: 07/03/2019

Banca examinadora:

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

Prof. Dra. Mariana Cristina Hoepfner Rondelli  
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista

Prof. Dra. Eliza Rossi Komninou  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dra. Luciana Bicca Dode  
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

**Para Maria e Euani Anastácio e todas as  
mulheres fortes e valentes**

## **Agradecimentos**

Primeiramente à Deus e ao Universo, por me proporcionar a vida e oportunidades diárias, por me permitir que eu lute em busca dos meus sonhos, me dando coragem, saúde e amor para seguir em frente.

Aos meus pais, Aírto e Maria, que sempre me apoiaram e estiveram comigo. Sendo que mesmo com a imensa saudade e a falta da minha presença em casa, tiveram a força e a coragem de me deixar ir em rumo ao meu sonho. Por me incentivarem desde pequena a buscar o meu melhor e me ensinarem a verdadeira e real importância da educação na vida. Lutaram junto comigo, deixando muitas vezes de ter algo para si, para que o meu sonho pudesse se tornar realidade. Que tenhamos sempre força, fé e amor para encarar tudo pela felicidade.

Aos meus queridos irmãos Ecleairtom, Edivan e Euani, por sempre acreditarem em mim. Apesar da distância, sempre se fizeram presentes, sempre estiveram nos meus pensamentos e coração, me dando apoio carinho e amor. Vocês foram e são a minha força. Sempre foi e sempre será por vocês e para vocês.

Ao ReproPel, a todos os graduandos e pós-graduandos do grupo. Ao meu orientador Prof. Antonio Sergio Varela Junior e à minha coorientadora de estágio Prof. Carine, que sempre me incentivaram e me deram liberdade para que eu pudesse ir atrás dos meus objetivos. Todos vocês contribuíram enormemente para minha formação.

Enfim, a todas as pessoas, que tive a oportunidade de conhecer ao longo dessa jornada, que compartilharam comigo suas experiências e histórias, e que de algum modo foram importantes para o meu crescimento e amadurecimento.

Gratidão, vocês foram essenciais nessa jornada! E serei uma pessoa melhor por isso.

*Diziam que a menina era criada pelo vento.  
O vento à ensinou a voar em direção ao sol reluzente.  
O vento a levou para além daquele pequeno horizonte.*

## Resumo

Da Silva, Edenara Anastácio. **Nanopartículas de lipoproteína de baixa densidade na criopreservação do sêmen canino**. 2019. 44f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Estruturas na escala nanométrica apresentam propriedades funcionais únicas, não encontradas na escala macro, devido principalmente à elevada área superficial de contato, que resulta em uma intensa interação com a matriz na qual as nanopartículas estão inseridas. Em diluentes de criopreservação seminal à base de gema de ovo, o principal componente crioprotetor é a lipoproteína de baixa densidade (LDL). Contudo, a gema de ovo possui outros constituintes que são deletérios para os gametas, neste contexto, a extração das micelas de LDL para congelamento seminal, através da fração plasmática da gema de ovo (EYP) vem demonstrando melhores resultados. Diante do exposto, este trabalho objetivou avaliar diferentes processos de produção nanopartículas de LDL, sobre a qualidade do sêmen canino criopreservado. EYP foi submetido à três sistemas: banho de ultrassom (LDL-B) - 30min em 40A; ponteira de ultrassom (LDL-P) - 50% da amplitude, 30min; homogeneização de alta pressão (LDL-P) - 10.000PSI por 6 ciclos. Propriedades de diâmetro, índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta dos diluentes foram avaliados. A qualidade espermática após o descongelamento foi mensurada através do *computer-assisted sperm analysis* (CASA) e citometria de fluxo. As nano técnicas aplicadas em EYP modificaram propriedades de diâmetro, PDI e potencial zeta das partículas de LDL. LDL-P caracterizou-se como um sistema monodisperso (PDI = 0,37) e estável, enquanto nos outros grupos experimentais foram obtidas soluções polidispersas. O processamento de EYP formou diluentes de congelamento mais eficazes no controle da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular ( $P < 0,05$ ). Os sistemas de ultrassom (LDL-B e LDL-P) produziram micelas capazes de manter a maior motilidade espermática total, após o descongelamento ( $P < 0,05$ ). Comparado ao controle EYP, LDL-P foi mais eficiente na manutenção da motilidade espermática progressiva, integridade e fluidez de membrana ( $P < 0,05$ ). As nanopartículas LDL-P obtiveram tamanho médio de aproximadamente 250nm, com 0.3 de PDI e -1.15mV de potencial zeta. Sendo assim, a ultrassonicação por meio de sonda do EYP, demonstrou-se um método eficiente para produção de nanopartículas de LDL incrementando a crioproteção durante o congelamento do sêmen canino.

**Palavras-chave:** lipoproteína de baixa densidade; nanopartículas; diluente seminal; criopreservação; plasma de gema de ovo



## Abstract

Da Silva, Edenara Anastácio. **Low density lipoprotein nanoparticles in canine semen cryopreservation**. 2019. 43f. Dissertation (Master degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Structures on the nanometric scale have unique functional properties, not found on the macro scale, mainly due to the high surface area of contact, which results in an intense interaction with the matrix in which the nanoparticles are inserted. In seminal cryopreservation diluents based on egg yolk, the main cryoprotective component is low density lipoprotein (LDL). However, egg yolk has other constituents that are harmful to gametes, in this context, the extraction of the micelles of LDL for seminal freezing, through the plasma fraction of the egg yolk (EYP) has been showing better results. Given the above, this study aimed to evaluate different LDL nanoparticles production processes, on the quality of cryopreserved canine semen. EYP was submitted to three systems: ultrasound bath (LDL-B) - 30min at 40A; ultrasound probe (LDL-P) - 50% of amplitude, 30min; high pressure homogenization (LDL-P) - 10,000PSI for 6 cycles. Diameter properties, polydispersity index (PDI) and zeta potential of the diluents were evaluated. Sperm quality after thawing was measured using computer-assisted sperm analysis (CASA) and flow cytometry. The nano techniques applied in EYP modified properties of diameter, PDI and zeta potential of LDL particles. LDL-P was characterized as a monodisperse system (PDI = 0.37) and stable, while in the other experimental groups polydisperse solutions were obtained. The processing of EYP formed freezing diluents that were more effective in controlling the production of reactive intracellular oxygen species ( $P < 0.05$ ). The ultrasound systems (LDL-B and LDL-P) produced micelles capable of maintaining the highest total sperm motility, after thawing ( $P < 0.05$ ). Compared to the EYP control, LDL-P was more efficient in maintaining progressive sperm motility, integrity and membrane fluidity ( $P < 0.05$ ). The LDL-P nanoparticles obtained an average size of approximately 250nm, with 0.3 of PDI and -1.15mV of zeta potential. Therefore, ultrasound using an EYP probe has proven to be an efficient method for the production of LDL nanoparticles, increasing cryoprotection during the freezing of canine semen.

**Keywords:** low density lipoprotein; nanoparticles; semen extender; cryopreservation; egg yolk plasma

## Lista de Figuras

Figura 1	Número de publicações científicas em reprodução de cães, de 2000 até 2017.....	16
----------	--	----

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ACRO	Acrosome integrity
ALH	Amplitude of lateral head displacement
BCF	Flagellar cross beat frequency
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
CDI	Cell disruption index
CFDA	Carboxyfluorescein diacetate
DAP	Average trajectory distance
DCL	Curvilinear distance
DSL	Progressive linear distance
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EYP	Plasma de gema de ovo/Egg yolk plasma
FDNA	DNA fragmentation index
HDL	Lipoproteína de alta densidade
LDL	Lipoproteína de baixa densidade/Low density lipoprotein
LIN	Linearity
LPO	Lipid peroxidation
LSD	Leats Significant Difference
M540	Merocyanine 540
MI	Membrane integrity
MIT	Mitochondrial functional
MF	Membrane fluidity
N	Número
PBS	Phosphate buffered saline
PDI	Potencial de polidispersão/Polydispersion index
PI	Propidium iodide

PH	Potencial Hidrogeniônico
PM	Progressive motility
PMT	Photomultiplier
PSI	Pound force per square inch
ROS	Reactive oxygen species
RPM	Rotação por minuto
STR	Straightness
TM	Total motility
UV	Ultravioleta
VAP	Average trajectory velocity
VCL	Curvilinear velocity
VSL	Progressive linear velocity
WOB	Oscillation coefficient

## Lista de Símbolos

<	Menor
>	Maior
®	<i>Registered Sing</i>
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
ζ	Zeta
min	Minuto
mL	Militro
mM	Milimolar
A	Amperes
g	Gramma
h	Hora
s	Segundo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μg	Micrograma
mV	Milivolts
Hz	Hertz
μm	Micrometro
M	Molar

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>14</b>
<b>2 Objetivos.....</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Objetivo geral.....</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>18</b>
<b>3. Considerações Finais.....</b>	<b>19</b>
<b>Referências.....</b>	<b>20</b>

## 1 Introdução

De acordo com o antigo ditado inuíte da ilha de Baffin “Quando estamos com nossos cães, não há espaço para a solidão de espírito. Temos uma relação”. Esta sentença retrata o resultado de uma história que se iniciou há cerca de 15 mil anos, entre os homens e os cães (*Canis lupus familiaris*), a primeira espécie domesticada (SAVOLAINEN *et al.*, 2002). Neste período histórico, iniciava uma parceria primitiva entre o homem e o cão.

Os valores originais dos cães são fundamentais ainda hoje, e estão intimamente ligados à evolução cultural e psicológica da humanidade (LOPES, 2012). Devido a sua sociabilidade, comparável apenas a nossa, os cães consideram-se integrantes da família e, já nos primórdios, protegiam naturalmente o território onde moravam, latindo e servindo como guardas (FOGLE, 2009). Contribuíram para o êxito de caçadas, com sua alta velocidade e excelente faro, além da surpreendente capacidade de entender o que queremos deles, ao ler nos gestos ou mesmo o olhar.

Não obstante, os filhotes serviam de diversão e companhia (FOGLE, 2009). Logo o acasalamento destes, já não era mais por instinto, e sim controlado pelo homem, ocorrendo assim, os primeiros cruzamentos seletivos de cães, com o intuito de perpetuar os atributos que o homem considerava vantajoso (CLUTTON-BROCK; SERPELL, 1995).

A seleção artificial na espécie canina para realçar tais atributos aumentou, e há 5 mil anos já existiam todos os tamanhos e formatos dos cães de hoje, sendo que nos últimos 200 anos, essa atividade se tornou uma verdadeira indústria, com padrões de *kennel clubs* para centenas de raças (FOGLE, 2009). Nesse decurso evolutivo, a reprodução dirigida realizada pelo homem, sobre a espécie canina, demonstra-se muito longínqua, mesmo que inicialmente, realizada de forma empírica.

Os primeiros registros bibliográficos técnicos de observação da reprodução de cães, com enfoque científico, datam do ano de 1780, onde o célebre naturalista italiano Lazzaro Spallanzani, realizou a primeira demonstração de inseminação

artificial bem sucedida, como experimento investigativo dos processos reprodutivos na classe dos mamíferos (MIES FILHO, 1970). Apesar dos primeiros estudos terem sido realizados ao final do século XVII, a área passou por um grande vazio concernente ao desenvolvimento e difusão de novas biotécnicas reprodutivas na espécie canina (GONÇALVES; DE FIGUEIREDO; DE FIGUEIREDO, 2008).

Nos últimos anos a criação de cães deixou de ser um *hobby*, passando a ser uma atividade lucrativa. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação (ABINPET, 2017), no segmento do agronegócio relacionado ao desenvolvimento das atividades de criação, produção e comercialização de animais de estimação, o Brasil é o 3º maior mercado mundial, faturando em 2016 a estimativa de 18,9 bilhões de reais, adicionalmente, cerca de 1 bilhão apenas no setor de vendas de animais de estimação.

Não obstante, atualmente a espécie também é utilizada como modelo experimental para trabalhos científicos relacionados à preservação da biodiversidade de canídeos silvestres (MAKSUDOV; SHISHOVA; KATVOV, 2008).

No momento atual, uma quantidade expressiva de trabalhos científicos é produzida diariamente. Dados do *National Center for Biotechnology Information* demonstram que 45% de todos os trabalhos já realizados relacionados à reprodução de cães, foram publicados a partir do ano de 2009 (Figura 1). Incremento científico esse, devido, como descrito anteriormente, à grande importância econômica, afetiva e científica da espécie na atualidade.

Devido às crioinjúrias espermáticas, baixas taxas de concepção (45%) são descritas na literatura com a utilização de sêmen canino congelado na inseminação artificial por deposição vaginal (PAYAN-CARREIRA; MIRANDA; NIZANSKI, 2011). Neste contexto, é necessária a descrição de protocolos mais eficientes para a criopreservação seminal da espécie.

A nanotecnologia é uma área multidisciplinar, que envolve conhecimentos da biologia, química, engenharia e física (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007). Concentra-se na fabricação, manipulação, caracterização e aplicação de materiais com dimensões na magnitude da bilionésima parte do metro ( $1\text{nm} = 10^{-9}$  metros) (SAHOO *et al.*, 2007; SANTAMARIA, 2012) Este campo científico tem como interesse as propriedades funcionais únicas encontradas em estruturas na escala nano, não obtidas na escala de dimensões maiores (CHAU; WU; YEN, 2007).



A nanotecnologia fundamenta-se no aumento da reatividade química e dos efeitos quânticos dos materiais, através da diminuição do tamanho das partículas, alterando as propriedades elétricas, mecânicas, magnéticas e óticas, o que proporciona uma intensa interação com a matriz na qual as nanoestruturas estão inseridas (BALBUS *et al.*, 2006; ASSI *et al.*, 2012).

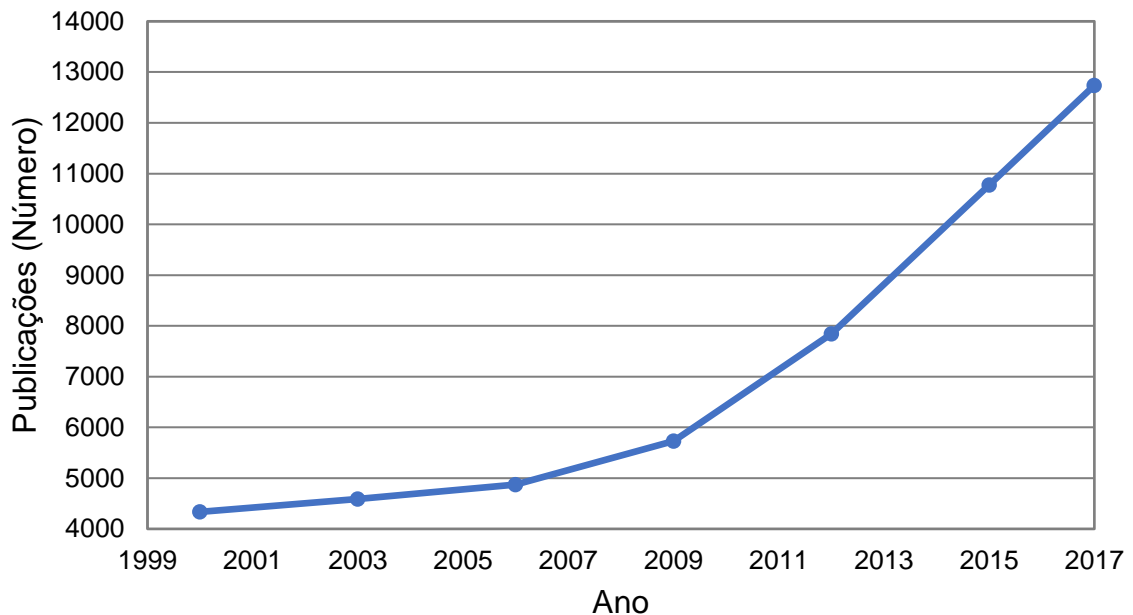


Figura 1: Número de publicações científicas em reprodução de cães, de 2000 até 2017. Fonte: Elaborado pelo autor de acordo com dados coletados na plataforma *National Center for Biotechnology Information* (2017).

Metodologias para a produção de partículas em escalas nanométricas influenciam na homogeneização, diminuição, dispersão e emulsificação de partículas (KENTISHA *et al.*, 2008). O homogeneizador de alta pressão atua nas partículas através de cisalhamento e cavitação, já o ultrassom exerce nas partículas a cavitação de baixa intensidade e uniformidade em sistemas de banho e alta amplitude e homogeneidade em mecanismos com ponteira ou sonda (MUKHERJEE; RAY; THAKUR, 2009; ASSI *et al.*, 2012; JIE PENG *et al.*, 2015).

A gema de ovo é um dos principais componentes de diluidores seminais, devido à sua capacidade de proteção contra o choque térmico durante a criopreservação (MOUSSA *et al.*, 2002). A LDL é o principal componente crioprotetor da gema de ovo, porém outros compostos, como a lipoproteína de alta densidade (HDL) podem ser deletérios para a criopreservação (AMIRAT *et al.*, 2004). Corcini *et*

*al.* (2016) demonstraram que a utilização apenas da fração plasmática da gema de ovo, constituída de LDL, é eficiente em diluentes de congelamento seminal de cães.

A LDL é uma bionanopartícula micelar, com monômeros de 8 a 1.200 nm de dimensões (HEVONOJA *et al.*, 2000; SKAJAA *et al.*, 2011; HARISA; ALANAZI, 2014). Diversos estudos indicam a ação da LDL, na proteção das células espermáticas contra o choque térmico e manutenção da motilidade após a criopreservação (BERNARDI; COOK, 1960 ; MOUSSA *et al.*, 2002; PRAPAIWAN *et al.*, 2016).

O efeito crioprotetor da LDL se deve principalmente à aderência das micelas na membrana plasmática dos espermatozoides (GRAHAM; FOOTE, 1987; BERGERON *et al.*, 2004), e a formação de interface entre ácidos graxos e água (ANTON *et al.*, 2003), além de promover a entrada de fosfolipídios e colesterol na membrana celular (BERGERON *et al.*, 2004), formar complexos com proteínas do plasma seminal, evitando a ação deletéria destas sobre as membranas (MANJUNATH *et al.*, 2002). No congelamento de sêmen canino, a concentração ideal de LDL é de 8% (VARELA JUNIOR *et al.*, 2009).

A utilização de lipossomas, um tipo de estrutura nanométrica fosfolipídica, já foi descrita como eficiente na preservação de espermatozoides bovinos (GRAHAM e FOOTE, 1987), ovinos (HOLT; NORTH, 1988), suínos (HE; BAILEY; BUAR, 2001), galos (BONGALHARDO, 2013) e búfalos (KUMAR *et al.*, 2015). Lipossomas compostos especificamente de LDL demonstraram resultados promissores para a criopreservação de sêmen de cães (BELALA *et al.*, 2016a; BELALA *et al.*, 2016b).

Geradores de ultrassons e homogeneizadores de alta pressão, são métodos mecânicos de formação de energia que podem ser empregados para a produção de nanoestruturas compostas por lipídios (DAS; CHAUDHURY 2011), desta forma podendo manipular nanoformas de micelas de como a Lipoproteína de baixa densidade (LDL), com possíveis incrementos na eficiência de interação e absorção durante a criopreservação.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Avaliar diferentes protocolos de produção de nanopartículas de lipoproteína de baixa densidade provenientes do plasma de gema de ovo, sobre a manutenção da viabilidade do sêmen canino criopreservado.

### **2.2 Objetivo específicos**

1) Caracterizar nanopartículas de lipoproteína de baixa densidade, produzidas por ultrassonicação através de ultrassom e homogeneizador de alta pressão em diluentes de congelamento de sêmen canino.

2) Mensurar o tamanho médio, potencial zeta e índice de polidispersão de nanopartículas de lipoproteína de baixa densidade em diluentes de congelamento seminal de cães.

3) Analisar *in vitro* a estrutura morfológica, funcional e cinética dos espermatozoides submetidos ao congelamento com diferentes diluentes contendo nanopartículas de lipoproteína de baixa densidade.

### **3. Considerações Finais**

Os três métodos aplicados em EYP para a produção de nanopartículas de LDL modificaram o diâmetro médio das partículas. O índice de polidispersão (PDI) da nanoemulsão produzida por ultrassonicação por meio de ponteira de ultrassom formou um sistema monodisperso, enquanto as demais soluções apresentaram-se como polidispersas.

O processamento de EYP formou soluções mais eficazes no controle da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular. Os dois sistemas de ultrassom produziram nanoemulsões capazes de manter a maior motilidade espermática total após o descongelamento, quando comparado aos demais grupos. Adicionalmente, comparado ao controle EYP a nanoemulsão produzida por ponteira de ultrassom foi mais eficiente na manutenção da motilidade espermática progressiva, integridade e fluidez de membrana.

Correlações significativas observadas neste estudo, indicaram que o diâmetro médio está associado à menor integridade de membrana, maiores níveis de ROS e à alta taxa de fluidez de membrana.

A superioridade das propriedades físico-químicas das nanopartículas de LDL obtidas através de ultrassonicação por ponteira de ultrassom, possibilitou a maximização do efeito biológico e crioprotetor de LDL, devido possivelmente ao aumento de área superficial de contato e interação das nanopartículas de LDL com os espermatozoides, demonstrando, desta forma a eficiência do sistema para a produção de nanopartículas de LDL para manutenção da qualidade espermática pós descongelamento.

Nanopartículas de LDL produzidas a partir do plasma de gema de ovo por sistema de ponteira de ultrassom, apresentam potencial para novos estudos em busca do desenvolvimento e melhoria dos protocolos de congelamento do sêmen canino.

## Referências

- ABINPET**, Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação. Disponível em < <http://abinpet.org.br/site/mercado/>> Acesso em: 27 nov. 2017.
- AMIRAT, L.; TAINTURIER, D.; JEANNEAU, L.; THORIN, C.; GERARD, O; COURTENS, J. L; 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, n.5, p.895-907, 2004.
- ANTON, M.; MARTINET, V.; DALGALARRONDO, M.; BEAUMAL, V; DAVID-BRIAND, E.; RABESONA H. Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. **Food Chemistry**, n.83, v.2, p.175–183, 2003.
- ASSI, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L. A. Characteristics of nanoparticles and their potential applications in foods. **Brasilian Journal of Food Technology**, v.15, n.2, p.99-109, 2012
- BALBUS, J. M.; FLORINI, K.; DENISON, R. A.; WALSH, S. A. Getting it right the first time: developing nanotechnology while protecting workers, public health, and the environment. **Annals of the New York Academy Sciences**, v. 1076, p.331-342, 2006.
- BELALA, R.; BRIAND-AMIRAT, L.; VINCIGUERRA, L.; TAINTURIER, D.; KAIDI, R.; THORIN, C.; MICHAUD, S.; ANTON, M.; BENCHARIF, D. 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.; DELAY, J.; AMIRAT, L.; ROPERS, M.-H.; LE GUILLOU, J.; ANTON, M.; SCHMITT, E.; THORIN, C.; MICHAUD, S.; KAIDI, R. The benefits of liposomes for chilling canine sperm for 4 days at 4° C. **Animal reproduction science** v.168, p.100-109, 2016b.
- BERGERON, A.; CRETE, M. H.; 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. **Biology of Reproduction**, v.70, n.3, p.708-717, 2004.

BERNARDI, G.; COOK, W. An electrophoretic and ultracentrifugal study on the proteins of the high density fraction of egg yolk. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.44, p.86-96, 1960.

BONGALHARDO, D. Produção e preservação do sêmen de galos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.37, n.2, p.131-135, 2013.

CHAU, C.; WU, S.; YEN, G. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, n.5, p.269-280, 2007.

CLUTTON-BROCK, J.; SERPELL, J. The Domestic Dog; its Evolution, Behavior and Interaction with People, **Cambridge University Press**, Cambridge, 1995.

CORCINI, C. D.; GOULARTE, K. L.; BONGALHARDO, D. C.; LUCIA, JR T.; JARDIM, R. D; VARELA JUNIOR, A. S. Effect of egg yolk plasma on dog sperm cryopreservation. **Andrologia**, v.48, n.1, p.114-115, 2016.

DAS, S.; CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.12, n.1, p.62-76, 2011.

FOGLE, B. **Cães**. 1.ed. Rio de Janeiro: Zahar, 2009. 345p.

GONÇALVES, P. B. D.; DE FIGUEIREDO, J. R; DE FIGUEIREDO FREITAS, V. J. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**, Editora Roca, 2008.

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, n.1, p.42-52, 1987.

HARISA, G. I.; ALANAZI, F. K. Low density lipoprotein bionanoparticles: From cholesterol transport to delivery of anti-cancer drugs. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v.22, n.6, p.504-515, 2014.

HE, L.; BAILEY, J.; BUHR, M. Incorporating Lipids into Boar Sperm Decreases Chilling Sensitivity but Not Capacitation Potential 1. **Biology of Reproduction**, v.64, n.1, p.69-79, 2001.

HEVONOJA, T.; PENTIKAINEN, M. O.; HYVONEN, M. T.; KOVANEN, P. T.; ALA-KORPELA M. Structure of low density lipoprotein (LDL) particles: basis for understanding molecular changes in modified LDL. **Biochimica Biophysica Acta**, v.1488, n.3, p.189-210, 1981.

HOLT, W.; NORTH, R. The role of membrane-active lipids in the protection of ram spermatozoa during cooling and storage. **Gamete Research**, v.19, n.1, p.77-89, 1988.

JIE PENG, W.; LING LI, J. D.; JIA-MING XU, DU-JIA JIN, XUE-JUN XIA, YU-LING LIU. Effect of high-pressure homogenization preparation on mean globule size and large-diameter tail of oil-in-water injectable emulsions. **Journal of Food and Drug Analysis**, v.23, n.4, p.828-835, 2015.

KENTISHA, S.; WOOSTERB, T. J.; ASHOKKUMARA, M.; BALACHANDRANA, S.; MAWSONB, R. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.9, n.2, p.170-175, 2008.

KUMAR, P.; SAINI, M.; KUMAR, D.; BALHARA, A.; YADAV, S.; SINGH, P.; YADAV P. Liposome-based semen extender is suitable alternative to egg yolk-based extender for cryopreservation of buffalo (*Bubalus bubalis*) semen. **Animal Reproduction Science**, v.159, p.38-45, 2015.

LOPES, K. R. F. Considerações sobre a importância do cão doméstico dentro da sociedade humana. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.3, p.177-185, 2012.

MAKSUDOV, G. Y.; SHISHOVA, N. V.; KATKOV, I. I. In the cycle of life: cryopreservation of post-mortem sperm as a valuable source in restoration of rare and endangered species. **Endangered Species: New Research Edition**, 1ed., p.89-240, 2008.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON A.; MENARD M. 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.

MIES FILHO, A. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**, Porto Alegre, Sulina, 6ed. 1970.

MOUSSA, M.; MARINET, 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, n.6, p.1695-1706, 2002.

MUKHERJEE, S.; RAY, S.; THAKUR R. S. Solid lipid nanoparticles: a modern formulation approach in drug delivery system. **Indian Journal of Pharmacological Sciences**, v.71, n.4, p.349-358, 2009.

PAYAN-CARREIRA R.; MIRANDA, S.; NIZANSKI, W. **Artificial insemination in dogs**. In: Manafi M (Ed.). *Artificial insemination in farm animals*, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-in-dogs>> Acesso em: 10 fev. 2019.

PRAPAIWAN, N.; THARASANIT, T.; PUNJACHAIPORNPOL, S.; YAMTANG, D.; ROONGSITTHICHAI, A.; MOONARMART, W.; KAEOKET, K.; MANEE-IN, S. Low-density Lipoprotein Improves Motility and Plasma Membrane Integrity of Cryopreserved Canine Epididymal Spermatozoa. **Asian-Australas Journal of Animal Sciences**, v.29, n.5, p.646-651, 2016.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Clinical Nanomedicine**, v.3, n.1, p.20-31, 2007.

SANTAMARIA, A. Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology. **Methods in Molecular Biology**, v.926, p.1-12, 2012.

SAVOLAINEN, P.; ZHANG, Y. P.; LUO, J; LUNDEBERG, J; LEITNER; T. Genetic evidence for an East Asian origin of domestic dogs. **Science**, v. 298, p.1610-1613, 2002.

SILVA, A. C.; SANTOS, D.; FERREIRA, D; LOPES C. M. Lipid-based nanocarriers as an alternative for oral delivery of poorly water- soluble drugs: peroral and mucosal routes. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, n.26, p.4495-4510, 2012.

SKAJAA, T.; CORMODE, D. P.; JARZYNA, P. A; DELSHAD, A.; BLACHFORD, C.; BARAZZA, A.; FISHER, E. A.; GORDON, R. E.; FAYAD, Z. A.; MULDER, W. J. The biological properties of iron oxide core high-density lipoprotein in experimental atherosclerosis. **Biomaterials**, v.32, v.1, p.206-213, 2011.

VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; ULGUIM, R. R.; ALVARENGA, M. V.; BIANCHI, I.; CORREA, M. N.; LUCIA, T. JR.; DESCHAMPS, J. C. Effect of low density lipoprotein on the quality of cryopreserved dog semen. **Animal Reproduction Science** v.115, n.4, p.323-327, 2009.