

CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS DO PLASMA SEMINAL E SUA RELAÇÃO COM A CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN OVINO EM DIFERENTES DILUENTES

*(Protein concentration of seminal plasma and their relation with
cryopreservation of ram semen using differents extenders)*

José Maurício Maciel CAVALCANTE^{1*}; Oscar Oliveira BRASIL¹; Gyselle Viana
AGUIAR¹; Carminda Sandra SALMITO-VANDERLEY¹; Arlindo
Alencar Araripe MOURA²; José Ferreira NUNES¹

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Av. Dr. Silas Munguba, 1700.
Campus Itaperi, Fortaleza, Ce. CEP: 60.740-000; ²Depto de Zootecnia, Universidade
Federal do Ceará (UFC). *E-mail: jmmcavalcante@bol.com.br

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre a concentração de proteínas no plasma seminal ovino com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em diluentes TRIS e em Água de Coco em Pó (ACP^{102c}). Um total de 12 coletas/animal em ovinos Santa Inês (n=2) e Dorper (n=2) foram realizadas para obtenção do plasma seminal e para criopreservação nos diluentes de trabalho. Foi utilizado o método de Bradford para determinação da concentração de proteína. Para avaliação do sêmen fresco e criopreservado foram utilizados os testes de viabilidade por eosina-nigrosina e teste hiposmótico (HOST), além dos parâmetros de motilidade em sistema de análise de sêmen auxiliada por computador (CASA). Baseado no valor médio da concentração de proteína, os ejaculados foram agrupados em alta (AP) e baixa (BP) concentração proteica. Correlações significativamente positivas foram encontradas entre a concentração de proteína com os parâmetros motilidade progressiva (PROG) e congelabilidade (CONGEL), e negativa para deslocamento lateral de cabeça (ALH) nas amostras criopreservadas em ambos os diluentes, além de correlação positiva para motilidade total (MOT) em TRIS. Sêmen de ejaculados do grupo AP criopreservados em TRIS apresentaram MOT, PROG e CONGEL significativamente superior ao grupo BP e inferiores para ALH. Quando criopreservado em ACP^{102c}, sêmen do grupo AP foi superior ao BP para PROG e CONGEL. Variações na qualidade do sêmen criopreservado entre ejaculados podem estar associados à concentração de proteínas do plasma seminal, e estas podem atuar na manutenção da progressividade de espermatozoides ovinos criopreservados em diluentes TRIS e ACP^{102c}.

Palavras-chave: Plasma seminal, proteína, Tris, ACP, CASA.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the relation between the protein concentration in ram seminal plasma and quality parameters of the semen cryopreserved in TRIS and Coconut Water Powder (ACP^{102c}) extenders. A total of 12 semen collections/animal of Santa Ines (n=2) and Dorper (n=2) rams were performed to obtain seminal plasma and semen cryopreservation in work extenders. The protein content was determined using the Bradford's method. The eosin-nigrosin and hyposmotic (HOST) viable tests and motility

parameters obtained by computer assisted semen analysis were evaluated for fresh and cryopreserved semen. The ejaculates were grouped in high (AP) and low (BP) protein content, based on the mean value of protein concentration. Significantly positive correlations were found between the protein content and progressive motility (PROG), freezability (CONGEL) and negative for lateral head displacement (ALH) in the semen cryopreserved in both extenders. Therefore, positive correlation was found for total motility (MOT) in TRIS. Semen samples from AP group cryopreserved in TRIS extender were significantly better than BP group for MOT, PROG and CONGEL, and inferior for ALH. When criopreserved in ACP^{102c} extender, the AP group were better than BP group for PROG and CONGEL. Variations in the quality of cryopreserved semen from different ejaculates may be associated with the concentration of seminal plasma proteins and may act to maintain the progressiveness of ram sperm cryopreserved in TRIS and ACP^{102c} extenders.

Key words: Seminal plasma, protein, Tris, ACP, CASA.

INTRODUÇÃO

A criopreservação do sêmen ovino permite a conservação da genética de reprodutores de interesse por longos períodos para seu uso em biotecnologias como a inseminação artificial. Entretanto, a criopreservação altera a capacidade funcional do espermatozoide, reduzindo sua motilidade e viabilidade, o que resulta em baixas taxas de concepção em ovelhas inseminadas por via cervical (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Em ovinos, proteínas do plasma seminal tem desempenhado importante papel na conservação seminal (BARRIOS *et al.* 2000), possuindo ação decapacitante e de estabilização da membrana (BARRIOS *et al.* 2005). Uma maior concentração de proteínas do plasma seminal é encontrada durante a estação reprodutiva, e por isso relacionada à fertilidade (SMITH *et al.*, 1999). Além disso, a adição de plasma seminal ou de suas proteínas apresenta efeito benéfico na qualidade do sêmen criopreservado (OLLERO *et al.*, 1997; CARDOZO *et al.*, 2009; LEAHY *et al.*, 2010) e na fertilidade de ovelhas inseminadas com sêmen resfriado (LÓPEZ-PÉREZ e PÉREZ-CLARIGET, 2011).

Variação entre reprodutores e entre ejaculados na fertilidade no sêmen congelado ovino tem sido relatada e atribuída à variação bioquímica do plasma seminal (WINDSOR, 1997). Dado o efeito das proteínas seminais na proteção dos espermatozoides ovinos ao dano do resfriamento e congelação, a variação na constituição proteica do plasma seminal pode estar relacionada com a qualidade do sêmen após criopreservação.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a relação entre a concentração de proteínas no plasma seminal ovino com parâmetros de qualidade do sêmen criopreservado em diluentes à base de TRIS e Água de Coco em Pó (ACP^{102c}).

MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA-UECE), processo nº 09233050-9. Foram realizadas 12 coletas de sêmen em ovinos das raças Santa Inês (n=2) e Dorper (n=2) com uso de vagina artificial. As coletas de sêmen ocorreram com intervalo de 2-3 dias, sendo

utilizados o segundo ejaculado de cada animal para criopreservação (OLLERO *et al.*, 1996).

O primeiro ejaculado foi utilizado para obtenção do plasma seminal. Após a coleta, cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume (medido em tubo graduado), concentração (por espectrofotometria), motilidade massal, percentual de espermatozoides móveis e vigor, segundo Chemineau *et al.* (1991), sendo utilizados apenas ejaculados com volume superior a 0,5 mL, concentração mínima de espermatozoides de $3,5 \times 10^9$ células/mL, motilidade massal e vigor mínimo de 3,5, percentual de espermatozoides móveis superior a 80% e percentual de patologias espermáticas inferior a 10%. O plasma seminal foi obtido após dupla centrifugação a 2500 rpm/15min e o sobrenadante acondicionado em tubos de 1,5 mL e conservados em nitrogênio líquido. Imediatamente antes da determinação da concentração de proteína, o plasma seminal descongelado foi centrifugado a $5000 \times g/20$ min. (4 °C) e o sobrenadante recentrifugado. A concentração de proteína do plasma seminal foi determinada pelo método de Bradford (1976), em reagente comercial (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Baseado no valor médio da concentração de proteínas dos ejaculados obtidos, estes foram agrupados em alta (AP) e baixa (BP) concentração proteica.

Os diluentes tris-frutose-gema de ovo (TRIS) e à base de Água de Coco em Pó para criopreservação de sêmen ovino (ACP^{102c}) foram utilizados para a criopreservação e preparados em duas frações (fração “A” e “B”). A fração “A” do diluente ACP^{102c} foi preparada segundo recomendação do fabricante (ACP Biotecnologia, Fortaleza, CE, Brasil), com acréscimo de 1×10^6 IU/L penicilina e 1g/L estreptomicina, além de 15% (v/v) de gema de ovo. A fração “A” do diluente TRIS consistiu em 300 mM de Tris (hidroximetil) aminometano, 94,7 mM ácido cítrico, 27,7 mM frutose, 15% (v/v) gema de ovo, 1×10^6 IU/L penicilina e 1g/L estreptomicina (EVANS e MAXWELL, 1990). A fração “B” de cada diluente teve a mesma constituição da fração “A” com acréscimo de 10% de glicerol. As amostras de sêmen de cada ejaculado foram divididas em duas alíquotas e diluídas nas frações “A” de ACP^{102c} e TRIS a 32 °C, obtendo concentração de 800×10^6 sptz/mL. O sêmen diluído foi resfriado a 4 °C em 120 minutos, quando então foi adicionada a fração “B” de cada diluidor, em três etapas, obtendo concentração final de 400×10^6 sptz/mL. O sêmen foi mantido em equilíbrio a 4 °C por duas horas, envasado em palhetas de 0,25 mL, e congeladas em vapor de nitrogênio líquido por 10 minutos em suportes a 3,5 cm do nível do nitrogênio líquido no interior de caixa térmica, e estocadas em botijões criogênicos. Uma palheta por diluente e de cada ejaculado foi descongelada a 37 °C por 30 segundos e seu conteúdo alocados em microtubos de 1,5 mL mantidos a 37 °C para avaliação. O sêmen fresco, criopreservado em TRIS e ACP^{102c} foram avaliados para viabilidade, teste hiposmótico e motilidade.

Para a avaliação da viabilidade foi adotada a metodologia de confecção de esfregaços de sêmen corados com eosina-nigrosina, segundo metodologia de Chemineau *et al.* (1991). Duzentos espermatozoides por lâmina foram avaliados para o percentual de células não coradas (viáveis) em microscópio óptico (400x).

O teste hiposmótico foi utilizado para avaliação da integridade funcional da membrana espermática por incubação de 10 µL de sêmen diluído em 100 µL de solução hiposmótica (0,90 g frutose, 0,49 g citrato de sódio em 100 mL de água destilada) a 37 °C

por 60 min e avaliadas 200 células espermáticas em microscópio de contraste de fase (1000x), e determinado o percentual de espermatozoides com dobramento de flagelo, tidos como células com membranas funcionalmente intactas (BUCAK *et al.*, 2009).

A análise de motilidade foi realizada em sistema de análise de sêmen auxiliada por computador (CASA) com uso do programa Sperm Class Analyser® (SCA®, Microptic S.L, Barcelona, Espanha). Foram utilizados os seguintes parâmetros do programa: 25 quadros/s, número de quadros: 25/campo; velocidade limite para espermatozoides lentos: 30µm/s, limite para velocidade média: 60 µm/s, retilinearidade mínima para espermatozoides progressivos: 80%. Para a avaliação, o sêmen a 37 °C foi diluído a 40 x10⁶sptz/mL em solução citrato-glicose (EVANS e MAXWELL, 1990). Dez microlitros dessa suspensão foram colocados entre lâmina e lamínula de microscopia pré-aquecida a 37 °C. Um mínimo de 1000 espermatozoides foram avaliados pelo sistema CASA em microscópio de contraste de fase para os parâmetros: percentual de espermatozoides móveis (motilidade total - MOT), percentual de espermatozoides com movimento progressivo (motilidade progressiva - PROG), velocidade curvilinear (VCL - µm/s), velocidade média do percurso (VAP - µm/s), linearidade (LIN - %), retilinearidade (STR - %), deslocamento lateral de cabeça (ALH - µm) e frequência de batimento cruzado (BCF - Hz).

Baseado nos valores de PROG foi calculado para cada amostra de sêmen criopreservado em diluente TRIS ou ACP^{102c} o parâmetro congelabilidade (CONGEL), definido como a relação percentual da motilidade progressiva do sêmen criopreservado em relação ao mesmo parâmetro no sêmen fresco do mesmo ejaculado (CONGEL(%)= PROG do sêmen criopreservado/PROG do sêmen fresco*100) (ANEL *et al.*, 2003).

Para a análise estatística, os resultados foram expressos em média±desvio padrão. Após transformação em arco seno dos valores em percentual, as médias entre os parâmetros avaliados para o sêmen fresco, criopreservado em TRIS e ACP^{102c} foram submetidas à ANOVA, seguido de teste de Tukey para diferença estatística com nível de significância de 5%. Foi utilizado o teste de correlação de Pearson para determinar a associação entre a concentração de proteínas de cada ejaculado com os parâmetros avaliados do sêmen criopreservado em TRIS e ACP^{102c}. Foi utilizado o teste T de Student para comparação entre ejaculados agrupados em AP e BP para concentração proteica e dos parâmetros de motilidade e de congelabilidade de amostras de sêmen congeladas em TRIS e ACP^{102c} que apresentaram correlação com a concentração proteica. Foi adotado nível de significância estatística de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados do sêmen fresco e criopreservados em diluentes TRIS e ACP-102c para os parâmetros avaliados estão apresentados na Tab. 01. Excetuando os parâmetros LIN, STR, ALH e BCF, em todos os demais parâmetros o sêmen fresco apresentou valores estatisticamente superiores ao sêmen criopreservado em ambos os diluentes. Estes efeitos são atribuídos à criopreservação, que induz danos físicos nas células (HOLT, 2000), com alterações ultraestruturais, bioquímicas e funcionais que ocorrem durante o processo de

criopreservação, levando à redução da motilidade e perda de viabilidade espermática (SALAMON e MAXWELL, 2000).

Tabela 01: Média±desvio padrão dos percentuais dos parâmetros avaliados de viabilidade espermática, teste hiposmótico (HOST) e de motilidade avaliados em sistema CASA do sêmen ovino fresco e criopreservado em TRIS e ACP^{102c}.

Parâmetro	Sêmen fresco	Sêmen criopreservado	
		TRIS	ACP ^{102c}
Viabilidade (%)	85,9±8,7 ^a	45,6±14,8 ^b	48,7±9,4 ^b
HOST (%)	61,8±13,0 ^a	43,5±10,4 ^b	38,6±9,1 ^b
MOT (%)	88,6±5,7 ^a	67,0±15,2 ^b	50,1±20,8 ^c
PROG (%)	52,3±7,8 ^a	36,3±9,6 ^b	27,1±11,0 ^c
VCL (µm/s)	144,8±18,2 ^a	118,3±15,9 ^b	119,5±15,3 ^b
VAP (µm/s)	125,3±17,7 ^a	100,8±16,6 ^b	107,5±14,6 ^b
LIN (%)	70,9±4,8 ^b	68,4±5,0 ^b	74,3±5,6 ^a
STR (%)	82,0±3,5 ^a	80,6±3,8 ^a	82,5±4,0 ^a
ALH (µm)	3,0±0,5 ^a	2,9±0,3 ^a	2,5±0,4 ^b
BCF (Hz)	8,4±1,2 ^a	8,4±0,5 ^a	8,2±0,7 ^b

Letras diferentes entre colunas dentro do mesmo parâmetro indicam diferenças estatísticas (p<0,05).

O diluente TRIS apresentou valores estatisticamente superiores ao diluente ACP^{102c} para os parâmetros MOT, PROG, ALH e BCF e inferiores para o LIN. Ambos diluentes não diferiram entre si para viabilidade, HOST, VCL, VAP e STR. Estes resultados podem indicar que o TRIS e o ACP^{102c} apresentam semelhante proteção da integridade estrutural (viabilidade) e funcional (HOST) da membrana espermática, dos parâmetros cinéticos (VCL e VAP) e de qualidade de movimento (STR), mas não no percentual de espermatozoides móveis e com movimento progressivo.

Os parâmetros ALH, BCF e LIN devem ser vistos em conjunto, pois estes valores são comumente utilizados na diferenciação cinética de subpopulações espermáticas com alta e baixa progressividade, com as de alta progressividade apresentam maiores valores de LIN e menores de ALH, diferente das subpopulações com espermatozoides não progressivos com padrão de movimento semelhante ao de hiperativação, que apresentam baixo LIN e alto ALH (MUIÑO *et al.*, 2008; DORADO *et al.*, 2010). O maior valor para o parâmetro LIN e menor para ALH e BCF no sêmen criopreservado em ACP^{102c} pode estar relacionado a uma maior progressividade de seus espermatozoides, e/ou uma menor subpopulação espermática com movimento não progressivo ou hiperativado. As diferenças no parâmetro PROG entre TRIS e ACP^{102c} foram refletidos em suas congelabilidades, onde o diluente TRIS apresentou significativamente melhor resultado quando comparado ao diluente ACP^{102c} (70,7±20,1% e 53,9±25%, respectivamente).

Correlação moderada, mas significativa foi encontrada entre a concentração de proteína do plasma seminal com os parâmetros MOT, PROG, ALH e CONGEL no sêmen criopreservado em TRIS (Tab. 02) e PROG, ALH e CONGEL para sêmen criopreservado em ACP^{102c} (Tab. 03), com correlação negativa apenas para o parâmetro ALH para ambos diluentes.

Tabela 02: Correlação da concentração de proteínas totais no plasma seminal de ovinos com parâmetros avaliados para o sêmen descongelado em diluente TRIS.

PARÂMETRO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA
Viabilidade	0,241
HOST	0,008
MOT	0,361*
PROG	0,307*
VCL	0,037
VAP	0,081
LIN	0,000
STR	-0,200
ALH	-0,432*
BCF	-0,067
Congelabilidade	0,385*

* Correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$)

A concentração de proteína do plasma seminal dos ejaculados obtidos foi de $27,9 \pm 5,5$ mg/mL, compatíveis com os obtidos por Smith *et al.* (1999), Ghaoui *et al.* (2007), Marco-Jimenez *et al.* (2008), mas inferiores a Marti *et al.* (2007). Os ejaculados agrupados em AP e BP apresentaram média de $32,97 \pm 2,84$ mg/mL e $23,3 \pm 2,4$ mg/mL respectivamente, com diferença significativa entre os grupos. Além do conteúdo proteico, os ejaculados dos grupos AP e BP diferiram nos parâmetros MOT, PROG, ALH e CONGEL para alíquotas de sêmen criopreservado em diluente TRIS (Tab. 04), e PROG e CONGEL para alíquotas de sêmen criopreservadas em ACP^{102c} (Tab. 05). Para ambos diluentes, o grupo AP foi estatisticamente superior ao grupo BP para os parâmetros PROG e CONGEL, além do parâmetro MOT para o diluente TRIS. O parâmetro ALH foi estatisticamente superior no grupo BP para o diluente TRIS, mas ambos os grupos não diferiram para este parâmetro no diluente ACP^{102c}. Como valores altos do parâmetro ALH podem estar relacionados à menor progressividade dos espermatozoides (MUIÑO *et al.* 2008; DORADO *et al.* 2010), valores estatisticamente menores para este parâmetro no

grupo AP concordam com maior percentual de células progressivas e com a congelabilidade observadas em TRIS.

Tabela 03: Correlação da concentração de proteínas totais no plasma seminal de ovinos com parâmetros avaliados para o sêmen descongelado em diluente ACP^{102c}.

PARÂMETRO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA
Viabilidade	-0,020
HOST	-0,018
MOT	0,144
PROG	0,331*
VCL	-0,144
VAP	-0,095
LIN	0,197
STR	0,198
ALH	-0,0336*
BCF	-0,090
Congelabilidade	0,367*

* Correlação estatisticamente significante (p<0,05)

Tabela 04: Média±desvio padrão para os parâmetros de motilidade total (MOT), motilidade progressiva (PROG), deslocamento lateral de cabeça (ALH) e congelabilidade (CONGEL) de sêmen ovino criopreservado em TRIS de ejaculados agrupados em alta e baixa concentração de proteína seminal (AP e BP, respectivamente).

GRUPO	MOT (%)	PROG (%)	ALH (µm)	CONGEL (%)
AP	72,7±16,5 ^a	39,5±10,4 ^a	2,8±0,3 ^b	78,8±21,3 ^a
BP	61,8±11,5 ^b	33,4±7,7 ^b	3,0±0,3 ^a	63,5±15,8 ^b

Letras diferentes entre linhas no mesmo parâmetro indicam diferença estatística (p<0,05).

As correlações encontradas para a concentração de proteínas totais do plasma seminal com os parâmetros de motilidade total e progressiva, ALH e congelabilidade concordam com trabalhos que apontam o efeito protetor das proteínas do plasma seminal ovino em espermatozoides contra os danos causados pelo resfriamento e criopreservação. Em ovinos, a adição de plasma seminal ou de sua fração proteica mantém a motilidade de espermatozoides submetidos a altas diluições (ASHWORTH *et al.* 1994), e na reversão dos

danos causados pelo resfriamento (*cold-shock*), aumentando a motilidade de espermatozoides criopreservados (MAXWELL *et al.* 1999; DOMINGUEZ *et al.* 2008, CARDOZO *et al.* 2009; LEAHY *et al.* 2010), e fertilidade (MAXWELL *et al.* 1999, REBOLLEDO *et al.* 2007). Este efeito protetor tem sido atribuído às proteínas RSVP14 e RSVP20 secretadas pelas vesículas seminais ovinas (BARRIOS *et al.* 2005; FERNANDEZ-JUAN *et al.*, 2006) e que formam o grupo de maior expressão no plasma seminal (CARDOZO *et al.*, 2008).

Tabela 05: Média±desvio padrão para os parâmetros motilidade progressiva (PROG), deslocamento lateral de cabeça (ALH) e congelabilidade (CONGEL) do sêmen ovino criopreservado em ACP^{102c} de ejaculados agrupados em alta e baixa concentração de proteína seminal (AP e BP, respectivamente).

GRUPO	PROG (%)	ALH (µm)	CONGEL (%)
AP	31,5±9,6 ^a	2,4±0,3 ^a	64,8±25,2 ^a
BP	23,1±10,7 ^b	2,6±0,4 ^a	21,2±15,8 ^b

Letras diferentes entre linhas no mesmo parâmetro indicam diferença estatística (p<0,05).

A estabilização da membrana está relacionada à ação decapacitante destas proteínas, que se ligam à membrana plasmática de espermatozoides danificados, restaurando-a (BARRIOS *et al.* 2000; PÉREZ-PÉ *et al.* 2001b). Em vista do efeito protetor destas proteínas do plasma seminal, é plausível que ejaculados com maior concentração de proteína no plasma seminal como as encontradas neste trabalho, tendam a oferecer maior crioproteção a seus espermatozoides.

Neste trabalho, não foi encontrada correlação entre a concentração proteica do plasma seminal com os parâmetros viabilidade e HOST. No entanto, tanto a viabilidade como HOST apresentaram correlações significativas com MOT e PROG para ambos diluidores (dados não mostrados). Ao contrário da avaliação do sistema CASA, que se caracteriza por ser precisa, acurada e objetiva (VERSTEGEN *et al.*, 2002; KATHIRAVAN *et al.*, 2011), a avaliação da viabilidade pela coloração com eosina-nigrosina apresenta certo grau de subjetividade, além de avaliar uma pequena população de espermatozoides (até 200 células/amostra) (FOSTER *et al.*, 2011), observação que também pode ser estendida ao HOST, levando a uma maior variabilidade e menor exatidão dos resultados, e que podem ter interferido na sua correlação com a concentração das proteínas totais do plasma seminal.

CONCLUSÃO

Estes resultados indicam que a concentração de proteína do plasma seminal de ovinos pode estar associada com uma maior motilidade total e progressiva e na congelabilidade de espermatozoides de carneiros criopreservados, sugerindo que estas

proteínas podem atuar na melhoria da progressividade de espermatozoides ovinos criopreservados em diluentes TRIS e ACP^{102c}.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pelo financiamento do projeto.

REFERÊNCIAS

ANEL, L.; DE PAZ, P.; ALVAREZ, M.; CHAMORO, C.A.; BOIXO, J.C.; MANSO, A.; GONZALEZ, M.; KAABI, M.; ANEL, E. Field and in vitro assay of three methods for freezing ram semen. *Theriogenology*, v.60, p.1293-1308, 2003.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

BUCAK M.N.; TUNCER P.B.; SARIÖZKAN, S.; ULUTAŞ, P.B. Comparison of the effects of glutamine and an amino acid solution on post-thawed ram sperm parameters, lipid peroxidation and anti-oxidant activities. *Small Ruminant Research*, v.81, p.13–17, 2009.

CARDOZO, J.A.; FERNANDEZ-JUAN, M.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Identification of RSVP14 and RSVP20 components by two-dimensional electrophoresis and western-blotting. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, p.15-21, 2008.

CARDOZO, J.A.; GRASA, P.; CEBRÁN-PÉREZ, J.A.; MUINO-BLANCO, T. Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Revista Corpoica*, v.10, p.51-59, 2009.

CHEMINEAU, P.; CAGNIE, Y.; GUERIN, Y.; ORGEUR, P.; VALLET, J.C. *Training Manual on Artificial Insemination in Sheep and Goats*. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy, 1991. 223p.

DOMINGUEZ, M.P.; FALCINELLI, A.; HOZBOR, F.; SANCHEZ, E.; CESARI, A.; ALBERIO, R.H. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, v.69, p.564-573, 2008.

DORADO, J.; MOLINA, I.; MUÑOZ-SERRANO, A.; HIDALGO, M. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Florida goats. *Theriogenology*, v.74, p.795-804, 2010.

EVANS, G., MAXWELL, W.M.C. *Inseminación artificial de ovejas y cabras*. 1ª ed., Editora Acribia, Zaragoza, 1990. 192p.

FOSTER, M.L.; LOVE, C.C.; VARNER, D.D.; BRINSKO, S.P.; HINRICHS, K.; TEAGUE, S.; LACAZE, K.; BLANCHARD T.L. Comparison of methods for assessing integrity of equine sperm membranes. *Theriogenology*, v.76, p.334-41, 2011.

GHAOUI, R.E.H.; THOMSON, P.C.; LEAHY, T.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Autologous whole ram seminal plasma and its vesicle-free fraction improve motility characteristics and membrane status but not in vivo fertility of frozen-thawed ram spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals*, v.42, p.541-549, 2007.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.2-22, 2000.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; KARTHIKEYA, G.; RENGARAJAN, K.; KADIRVEL, G., Objective Sperm Motion Analysis to Assess Dairy Bull Fertility Using Computer-Aided System – A Review. *Reproduction in Domestic Animals*, v.46, p.165–172, 2011.

LEAHY, T.; MARTI, J.I.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Animal Reproduction Science*, v.119, p.147-153, 2010.

LÓPEZ-PÉREZ, A.; PÉREZ-CLARIGET, R. Ram seminal plasma improves pregnancy rates in ewes cervically inseminated with ram semen stored at 5°C for 24 hours. *Theriogenology*, 2011. (DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.08.013)

MARCO-JIMENEZ, F.; VICENTE, J.S.; VIUDES-DE-CASTRO, M.P. Seminal plasma composition from ejaculates collected by artificial vagina and electroejaculation in Guirra ram. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, p.403-408, 2008.

MARTI, E.; MARA, L.; MARTI, J.I.; MUINO-BLANCO, T.; CEBRIAN-PEREZ, J.A.; Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*, v.67, p.1446-1454, 2007.

MAXWELL, W.M.C.; EVANS, G.; MORTIMER, S.T.; GILLAN, L.; GELLATLY, E.S.; McPHIE C.A. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reproduction, Fertility and Development*, v.11, p.123-126, 1999.

MUIÑO, R.; TAMARGO, C.; HIDALGO, C.O.; PEÑA, A.I. Identification of sperm subpopulations with defined motility characteristics in ejaculates from Holstein bulls: effects of cryopreservation and between-bull variation. *Animal Reproduction Science*, v.109, p.27-39. 2008.

OLLERO, M; MUIÑO-BLANCO, M.; LÓPEZ-PÉREZ, M.J.; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A. Viability of ram spermatozoa in relation to the abstinence period and successive ejaculations. *International Journal of Andrology*, v.19, p.287-292, 1996.

OLLERO, M; CEBRIÁN-PÉREZ, J.A.; MUIÑO-BLANCO, T. Improvement of cryopreserved ram sperm heterogeneity and viability by addition of seminal plasma. *Journal of Andrology*, v.18, p.732-739, 1997.

REBOLLEDO, A.D.; SIERRA, L.N.; TAMAYO, A.C.; LORIA, A.A.; DENIS, S.E.; OSES, R.B.; PARRA, E.G.; MONSREAL, L.P.; UGALDE, J.R. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. *Revista Científica (Maracaibo)*, v.17, p.73–76, 2007.

SALAMON, S.; MAXWELL, W.M. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000.

SMITH, J.F.; PARR, J.; MURRAY, G.R.; MCDONALD, R.M.; LEE, R.S-F. Seasonal changes in the protein content and composition of ram seminal plasma. *Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production*, v.59, p.223-225, 1999.

WINDSOR, D.P. Variation between ejaculates in the fertility of frozen ram semen used for cervical insemination of Merino ewes. *Animal Reproduction Science*, v.47, p.21-29, 1997.