



Plasma seminal ovino e sua aplicação na biotecnologia reprodutiva

Ram seminal plasma and use in reproductive biotechnology

J.M.M. Cavalcante^{1,3}, G.V. Aguiar¹, C.S. Salmito-Vanderley¹, A.A.A. Moura², J.F. Nunes¹

¹Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brasil.

²Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, CE, Brasil.

³Correspondência: jmmcavalcante@bol.com.br

Resumo

O plasma seminal de ovinos tem importante atuação na função espermática e na fertilização. Em ovinos, a adição do plasma seminal ou de suas proteínas tem apresentado resultados favoráveis na qualidade do sêmen ovino criopreservado. Entretanto, resultados divergentes têm sido obtidos, possivelmente relacionados à variação da composição do plasma seminal. Compreender a função e os mecanismos que envolvem a interação plasma seminal-espermatozoide poderia ajudar na formulação de diluidores seminais e aperfeiçoar protocolos de criopreservação.

Palavras-chave: proteínas seminais, ovinos, criopreservação.

Abstract

The ram seminal plasma plays a important role in sperm function and fertilization. The addition of seminal plasma or its proteins has presented favorable results in cryopreserved ram semen quality. However, divergent result has been obtained, possibly related to variation in the composition of seminal plasma. Understand the role and mechanisms involved in sperm-seminal plasma interaction could help to formulating seminal extenders and improve cryopreservation protocols.

Keywords: seminal proteins, ram, cryopreservation.

Introdução

O plasma seminal é uma secreção fisiológica originada das diversas glândulas do trato reprodutivo masculino, apresentando importante função na fisiologia espermática (Mann, 1978). Entretanto, tanto efeitos inibitórios como protetores dos diferentes componentes do plasma seminal têm sido encontrados (Muiño-Blanco et al., 2008).

Várias pesquisas nas mais diversas espécies têm sido realizadas visando atestar o efeito do plasma seminal na qualidade espermática e na fertilidade, bem como identificar os componentes responsáveis por essa ação (Muiño-Blanco et al., 2008). Em ovinos, proteínas do plasma seminal têm desempenhado importante papel na conservação seminal. Com esta revisão, busca-se abordar os efeitos de proteínas do plasma seminal na conservação do sêmen ovino e suas possíveis implicações na biotecnologia reprodutiva.

O plasma seminal ovino e a proteção da membrana de espermatozoides

Trabalhos iniciais com plasma seminal demonstraram efeito positivo na motilidade e no aumento da resistência de espermatozoides ao choque pelo frio (*cold-shock*), bem como efeitos deletérios em sua motilidade em diversas espécies (Pursel et al., 1973; Dott et al., 1979; Baas et al., 1983). Em ovinos, a adição de plasma seminal manteve a motilidade de espermatozoides submetidos a altas diluições bem como na reversão dos efeitos induzidos pelo *cold-shock*, sendo esta propriedade atribuída às proteínas do plasma seminal (Ashworth et al., 1994; Barrios et al., 2000; Pérez-Pé et al., 2001b). Essas proteínas ligam-se à membrana plasmática de espermatozoides danificados, restaurando-a (Barrios et al., 2000). Esse efeito protetor foi atribuído às proteínas de 14 kDa e 20 kDa (Barrios et al., 2005), secretadas especificamente pelas vesículas seminais ovinas, denominadas de RSV14 e RSV20, respectivamente (Fernandez-Juan et al., 2006).

A estabilização da membrana está relacionada à ação decapitante dessas proteínas, pois grande parte das proteínas RSV14 e RSV20 são liberadas da membrana do espermatozoide ovino após a capacitação e reação acrossomal, com redistribuição das proteínas remanescentes nas regiões equatorial e pós-acrossomal, sítios de interação espermatozoide-oócito durante a fertilização (Barrios et al., 2005).

A interação dessas proteínas com a membrana de espermatozoides se deve à presença de domínios de fibronectina tipo II na RSV-14 (Barrios et al., 2005), característico da família de proteínas BSP (*Binder of SPerm*), encontradas no plasma seminal de várias espécies de mamíferos (Manjunath et al., 2009), com



propriedade de ligação às fosfatidilcolinas na membrana espermática, às lipoproteínas de alta e baixa densidade (HDL e LDL) e à heparina (Manjunath e Thérien, 2002), essenciais na capacitação espermática e na ligação dos espermatozoides ao epitélio do oviduto (Manjunath et al., 2009). A RSVP-14 tomaria parte da estrutura proteica que rodeia a membrana espermática, ao estabilizar seus fosfolípidos, exercendo efeito protetor e de decapacitação (Barrios et al., 2005).

O plasma seminal e sua importância nas biotecnologias reprodutivas

O papel fisiológico conferido pelas proteínas do plasma seminal aos espermatozoides tem seu reflexo no manejo e nas biotecnologias reprodutivas, particularmente como marcadoras de fertilidade de reprodutores, criopreservação do sêmen e congelabilidade seminal, e nos resultados da inseminação artificial.

Seleção de reprodutores por sua congelabilidade seminal

Como proteínas do plasma seminal estão relacionadas com a função espermática, elas têm sido alvo na busca de marcadores moleculares que caracterizem reprodutores segundo a qualidade seminal após criopreservação.

Diferentes proteínas seminais podem afetar a qualidade do sêmen após criopreservação de modo diverso, podendo apresentar correlações positivas ou negativas com parâmetros seminais, influenciando na viabilidade espermática pós-descongelamento. Moura et al. (2010) verificaram a existência de *spots* proteicos do plasma seminal de carneiros com correlação positiva ou negativa com a integridade da membrana plasmática de espermatozoides criopreservados e observaram que essas diferentes proteínas poderiam atuar de maneira complementar na estabilidade da membrana e, conseqüentemente, na viabilidade e motilidade seminal.

Plasma seminal como marcadores de fertilidade

Estudos baseados na comparação da composição do plasma seminal entre reprodutores de diferentes fertilidades têm sugerido que o plasma seminal pode influenciar na fertilidade desses animais (Killian et al., 1993).

Diferenças significativas têm sido encontradas na caracterização proteica do plasma seminal entre reprodutores ovinos de alta e de baixa fertilidade e muitas dessas proteínas estão relacionadas à qualidade seminal. Yue et al. (2009) observaram que o conteúdo relativo de bandas proteicas diferia de animais de alta e de baixa fertilidade, além de estar relacionado também com a qualidade seminal.

Plasma seminal e sua relação com a estacionalidade reprodutiva

Em médias e altas latitudes, o fotoperíodo é o principal fator que controla a atividade sexual em pequenos ruminantes (Chemineau et al., 1991), com influências na qualidade e congelabilidade seminal em ovinos (D'Alessandro e Martemucci, 2003).

Diferenças no perfil proteico do plasma seminal de ovinos entre as estações reprodutiva e não reprodutiva foram observadas por Cardozo et al. (2006), com algumas das proteínas mais abundantes na estação não reprodutiva apresentando correlação negativa com a viabilidade espermática, além da maior expressão das proteínas RSVP14 e RSVP20 durante a estação reprodutiva, o que explica a melhor proteção dos espermatozoides do plasma seminal obtido nessa estação. Essas mudanças foram atribuídas à variação sazonal dos níveis de gonadotrofinas, a qual afetou a função endócrina gonadal e a secreção da vesícula seminal e do epidídimo. De fato, a adição ao sêmen criopreservado de ovinos de plasma seminal coletado na estação reprodutiva promoveu a motilidade e a fertilidade dos espermatozoides (Maxwell et al., 1999; Dominguez et al., 2008), melhor reversão dos danos de membrana espermática após *cold-shock* (Pérez-Pé et al., 2001a) e maior viabilidade quando da adição desse plasma seminal na criopreservação (Leahy et al., 2010b).

Variações sazonais nas defesas antioxidantes têm sido encontradas no plasma seminal ovino. Marti et al. (2007) encontraram maior atividade antioxidante na estação não reprodutiva, o que poderia auxiliar na fertilização do sêmen quando as condições reprodutivas não são ótimas. Entretanto, Yeni et al. (2010) não verificaram diferenças na capacidade antioxidante total durante o ano, apesar de ocorrer maior lipoperoxidação no verão e outono, indicativo de maior estresse oxidativo. Casao et al. (2010) sugerem que a melatonina participa na regulação das defesas antioxidantes do plasma seminal de ovinos, pois esta teve correlação com os teores da glutatona redutase, superóxido dismutase e catalase seminais. Esses resultados demonstram que a variação sazonal da atividade antioxidante do plasma seminal está em consonância com as alterações estacionais da qualidade do sêmen.



Plasma seminal ovino na conservação seminal

A inseminação artificial é uma biotecnologia reprodutiva que possibilita a rápida multiplicação das características zootécnicas de interesse de reprodutores, levando ao aumento da produtividade dos rebanhos. Em ovinos, seu uso com sêmen criopreservado tem sido limitado devido à baixa fertilidade obtida em ovelhas na inseminação por via cervical (Maxwell e Watson, 1996).

O uso de diluidores seminais satisfatórios se faz necessário para a conservação do sêmen visando à inseminação artificial (Salamon e Maxwell, 2000). Porém, seu uso implica também a diluição do plasma seminal, reduzindo sua participação na função espermática. A adição de plasma seminal em diluidores poderia recuperar seu papel protetor nos espermatozoides.

A criopreservação altera a capacidade funcional do espermatozoide, reduzindo sua motilidade e viabilidade, o que resulta em baixas taxas de concepção em ovelhas inseminadas cervicalmente (Salamon e Maxwell, 2000). No entanto, a interação dos espermatozoides com componentes proteicos do plasma seminal tem apresentado efeitos benéficos na motilidade e fertilidade do sêmen ovino criopreservado (Maxwell et al., 2007). A adição do plasma seminal ao sêmen descongelado elevou a motilidade espermática e reduziu o percentual de células capacitadas e com reação acrossomal (Maxwell et al., 1999), além de promover a fertilização *in vitro* de oócitos (Ghaoui et al., 2007a). O efeito benéfico do plasma seminal também é observado em sua adição ao diluidor seguida da criopreservação (Cardozo et al., 2009; Leahy et al., 2010b).

A incubação do plasma seminal ovino com sêmen descongelado possibilita a recuperação de proteínas seminais ligadas à superfície do espermatozoide perdidas no processo de criopreservação (Dominguez et al., 2008). As proteínas seminais ovinas, como a lactoferrina, a proteína secretória epididimária E1, a proteína sinaptossomal 29 e a RSVP-20, possuem propriedade de ligação à membrana plasmática de espermatozoides e aumentam a motilidade progressiva e de reparação do dano ultraestrutural após incubação com espermatozoides ovinos criopreservados (Bernardini et al., 2011).

O procedimento de criopreservação do sêmen sexado confere um impacto deletério adicional à qualidade seminal, muitos destes atribuídos à alta diluição do sêmen necessária durante a sexagem, reduzindo, conseqüentemente, a participação do plasma seminal (Maxwell e Johnson, 1999). Além disso, a combinação da sexagem com a criopreservação causa alterações na ligação das proteínas do plasma seminal à membrana espermática e, conseqüentemente, de sua ação na célula (Leahy et al., 2009). O perfil das proteínas de membrana difere entre espermatozoides sexados e não sexados, uma vez que as proteínas de 14kDa com domínios de fibronectina tipo 2, a citocromo oxidase 5a (Cox5a) e proteínas associadas à membrana (SLLP1) encontram-se três vezes mais abundantes na membrana de espermatozoides não sexados quando comparados aos sexados (Leahy et al., 2011). Entretanto, a adição do plasma seminal pode melhorar a integridade e a funcionalidade da membrana de espermatozoides sexados, o que demonstra ser ele efetivo na redução dos danos causados pela sexagem e pela criopreservação (Leahy et al., 2009).

A presença de enzimas antioxidantes no plasma seminal ovino também pode contribuir para a manutenção da qualidade do sêmen criopreservado contra os danos oxidativos. Entretanto, o processo de criopreservação reduz a atividade das enzimas antioxidantes do plasma seminal e modifica sua distribuição na membrana do espermatozoide (Marti et al., 2008). A adição de proteínas do plasma seminal antes da criopreservação aumenta a atividade enzimática antioxidante, além de restaurar a distribuição dessas enzimas semelhantemente à do sêmen fresco (Marti et al., 2008).

A afinidade das proteínas com domínios de fibronectina tipo II (proteínas BSP) ao LDL e à caseína em diluidores à base de gema de ovo e leite, respectivamente, pode implicar uma interação dessas proteínas com os diluidores seminais, de modo que o LDL e a caseína sequestrariam essas proteínas, tornando-as menos disponíveis para exercer seus efeitos na membrana espermática (Bergeron e Manjunath, 2006). A interação de componentes de diluidores seminais à base de gema de ovo ou leite poderia ter implicações quanto ao modo ideal de adição de proteínas do plasma seminal. Leahy et al. (2010b) avaliaram que a adição de proteínas do plasma seminal diretamente ao ejaculado resultou em maior percentual de espermatozoides viáveis com acrossoma intacto comparada à adição dessas proteínas ao criodiluyente, ainda que ambos os métodos tenham promovido a qualidade dos espermatozoides após criopreservação.

Plasma seminal e sua relação com a fertilidade na inseminação artificial ovina

A baixa fertilidade da inseminação cervical em ovelhas com sêmen criopreservado é um fator limitante dessa técnica, decorrente da anatomia excêntrica da cérvix ovina e da baixa viabilidade provocada pela capacitação e reação acrossomal precoce do sêmen criopreservado (Salamon e Maxwell, 2000). A reversão da criocapacitação pela adição de plasma seminal ou de suas proteínas específicas poderia aumentar a fertilidade dos espermatozoides criopreservados.

Em ovinos, a melhoria na qualidade do sêmen criopreservado pela adição de plasma seminal também é refletida na inseminação artificial por via cervical, com aumento na fertilidade de ovelhas (Maxwell et al., 1999; Rebollo et al., 2007). Entretanto, outros trabalhos não verificaram ação benéfica do plasma seminal na



fertilidade do sêmen ovino criopreservado (O'Meara et al., 2007; Ghaoui et al., 2007b), ou não observaram que essa ação não é obtida consistentemente (Leahy et al., 2010a). Esses resultados discordantes provavelmente se devem à variação da composição do plasma seminal utilizado, já que este varia segundo a raça, o indivíduo, a nutrição, o estresse, entre outros. (de Graaf et al., 2008).

O plasma seminal apresentou efeito positivo na fertilidade do sêmen ovino resfriado. A adição de 30% (v/v) de plasma seminal ovino a diluidores à base de Tris-gema de ovo aumentou a fertilidade de ovelhas após inseminação artificial por via cervical com sêmen ovino resfriado a 5°C por 24 horas. Esses resultados estão relacionados ao efeito decapacitante do plasma seminal, o qual prolonga a fertilidade de espermatozoides ovinos resfriados (López-Pérez e Pérez-Clariget, 2011).

Perspectivas sobre o uso do plasma seminal nas biotecnologias reprodutivas

A reversão dos efeitos da capacitação espermática e dos danos de membrana pelo plasma seminal ovino, a qual aumenta a fertilidade do espermatozoide criopreservado, tem importante implicação na conservação do sêmen nessa espécie. Neste sentido, Barrios et al. (2005) propõem que a adição da RSVP14 e RSVP20 aos diluidores seminais poderia proteger o sêmen ovino contra o choque térmico, permitindo melhorar os procedimentos de criopreservação.

Adicionalmente, uma melhor compreensão do papel das diferentes proteínas do plasma seminal possibilitaria o desenvolvimento de novas estratégias na conservação seminal. Apesar de se conhecer o papel de algumas proteínas do plasma seminal, outras proteínas podem ter importante atuação como marcadoras de fertilidade ou na proteção dos espermatozoides ao estresse térmico e ao estresse oxidativo, de modo que o conhecimento dos mecanismos que envolvem a interação proteína seminal-espermatozoide ou mesmo o uso dessas proteínas como aditivos poderia ajudar na formulação de melhores diluidores seminais e aperfeiçoar os protocolos de criopreservação (Muiño-Blanco et al., 2008).

Considerações finais

O plasma seminal e seus componentes proteicos têm demonstrado importante desempenho na conservação do sêmen de ovinos. Entretanto, os resultados divergentes entre autores reforçam o caráter complexo das várias atribuições que o plasma seminal possui nessa proteção. A compreensão da função dessas proteínas na proteção do espermatozoide e na regulação de sua ação na reprodução é de grande interesse na elaboração de diluidores seminais e de processos de conservação do sêmen dessa espécie, com importantes implicações na criopreservação do sêmen de reprodutores ovinos.

Referências

- Ashworth PJC, Harrison RAP, Miller NGA, Plummer JM, Watson PF.** Survival of ram spermatozoa at high dilution: protective effect of simple constituents of culture media as compared with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, v.6, p.173-180, 1994.
- Baas JW, Molan PC, Shannon P.** Factors in seminal plasma of bulls that affect the viability and motility of spermatozoa. *J Reprod Fertil*, v.68, p.275-280, 1983.
- Barrios B, Fernandez-Juan M, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA.** Immunocytochemical localization and biochemical characterization of two seminal plasma proteins that protect ram spermatozoa against cold shock. *J Androl*, v.26, p.539-549, 2005.
- Barrios B, Perez-Pe R, Gallego M, Tato A, Osada J, Muino-Blanco T, Cebrián-Pérez, JA.** Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol Reprod*, v.63, p.1531-1537, 2000.
- 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.
- Bernardini A, Hozbor F, Sanchez E, Fornés MW, Alberio RH, Cesari A.** Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology*, v.76, p.436-447, 2011.
- Cardozo JA, Fernandez-Juan M, Forcada F, Abecia A, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA.** Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*, v.66, p.841-850, 2006.
- Cardozo JA, Grasa P, Cebrián-Pérez JA, Muino-Blanco T.** Adición de proteínas del plasma seminal ovino durante la congelación del espermatozoide y efectos sobre su motilidad y viabilidad. *Rev Corpoica*, v.10, p.51-59, 2009.
- Casao A, Cebrian I, Asumpcao ME, Pérez-Pé R, Abecia JA, Forcada F, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T.** Seasonal variations of melatonin in ram seminal plasma are correlated to those of testosterone and antioxidant enzymes. *Reprod Biol Endocrinol*, v.8, p.59, 2010.
- Chemineau P, Cagnie Y, Guerin Y, Orgeur P, Vallet JC.** Training manual on artificial insemination in sheep



and goats. Rome: FAO, 1991. 222p.

D'Alessandro AG, Martemucci G. Evaluation of seasonal variations of semen freezability in Leccese ram. *Anim Reprod Sci*, v.79, p.93-102, 2003.

de Graaf SP, Leahy T, Marti J, Evans G, Maxwell WMC. Application of seminal plasma in sex-sorting and sperm cryopreservation. *Theriogenology*, v.70, p.1360-1363, 2008.

Dominguez MP, Falcinelli A, Hozbor F, Sanchez E, Cesari A, Alberio RH. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*, v.69, p.564-573, 2008.

Dott HM, Harrison RAP, Foster GCA. The maintenance of motility and the surface properties of epididymal spermatozoa from bull, rabbit and ram in homologous seminal and epididymal plasma. *J Reprod Fertil*, v.55, p.113-124, 1979.

Fernandez-Juan M, Gallego M, Barrios B, Osada J, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Immunohistochemical localization of sperm-preserving proteins in the ram reproductive tract. *J Androl*, v.27, p.588-595, 2006.

Ghaoui REH, Gillan L, Thomson, PC, Evans G, Maxwell WMC. Effect of seminal plasma fractions from entire and vasectomized rams on the motility characteristics, membrane status, and in vitro fertility of ram spermatozoa. *J Androl*, v.28, p.109-122, 2007a.

Ghaoui REH, Thomson PC, Leahy T, Evans G, Maxwell WMC. 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. *Reprod Domest Anim*, v.42, p.541-549, 2007b.

Killian GJ, Chapman DA, Rogowski LA. Fertility-associated proteins in holstein bull seminal plasma. *Biol Reprod*, v.49, p.1202-1207, 1993.

Leahy T, Evans G, Maxwell WMC, Marti JI. Seminal plasma proteins do not consistently improve fertility after cervical insemination of ewes with non-sorted or sex-sorted frozen-thawed ram spermatozoa. *Reprod Fertil Dev*, v.22, p.606-612, 2010a.

Leahy T, Marti JI, Crossett B, Evans G, Maxwell, WMC. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of membrane proteins from cytometrically sorted ram sperm. *Theriogenology*, v.75, p.962-971, 2011.

Leahy T, Marti JI, Evans G, Maxwell, WMC. Seasonal variation in the protective effect of seminal plasma on frozen-thawed ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.119, p.147-153, 2010b.

Leahy T, Marti JI, Evans G, Maxwell WMC. Seminal plasma proteins protect flow-sorted ram spermatozoa from freeze-thaw damage. *Reprod Fertil Dev*, v.21, p.571-578, 2009.

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*, v.77, p.395-399, 2012.

Manjunath P, Lefebvre J, Jois PS, Fan JJ, Wright MW. New nomenclature for mammalian BSP genes. *Biol Reprod*, v.80, p.394-397, 2009.

Manjunath P, Thérien I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *J Reprod Immunol*, v.53, p.109-119, 2002.

Mann T. Experimental approach to the study of semen and male reproductive function. *Int J Fertil*, v.23, p.133-137, 1978.

Marti E, Mara L, Marti JI, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Seasonal variations in antioxidant enzyme activity in ram seminal plasma. *Theriogenology*, v.67, p.1446-1454, 2007.

Marti E, Marti JI, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Effect of the cryopreservation process on the activity and immunolocalization of antioxidant enzymes in ram spermatozoa. *J Androl*, v.29, p.459-467, 2008.

Maxwell WMC, de Graaf SP, Ghaoui REH, Evans G. Seminal plasma effects on sperm handling and female fertility. *Soc Reprod Fertil Suppl*, v.64, p.13-38, 2007.

Maxwell WMC, Evans G, Mortimer ST, Gillan L, Gellatly ES, McPhie CA. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod Fertil Dev*, v.11, p.123-126, 1999.

Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of spermatozoa at high dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology*, v.52, p.1353-1362, 1999.

Maxwell WMC, Watson, PF. Recent progress in the preservation of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.42, p.55-65, 1996.

Moura PP, Franco MM, Silva T, Rocha TL, Leal DR, Passos PIB, Neves JP. Caracterização de proteínas do plasma seminal e sua relação com parâmetros de qualidade do semen criopreservado em ovinos. *Cienc Rural*, v.40, p.1154-1159, 2010.

Muiño-Blanco T, Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Domest Anim*, v.43, p.18-31, 2008.

O'Meara CM, Donovan A, Hanrahan JP, Duffy P, Fair S, Evans ACO, Lonergan P. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology*, v.67, p.1262-1268, 2007.



Pérez-Pé R, Barrios B, Muiño-Blanco T, Cebrián-Pérez JA. Seasonal differences in ram seminal plasma revealed by partition in an aqueous two-phase system. *J Chromatogr B*, v.760, p.113-121, 2001a.

Pérez-Pé R, Cebrián-Pérez JA, Muiño-Blanco T. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*, v.56, p.425-434, 2001b.

Pursel VG, Johnson LA, Schulman LL. Effect of dilution, seminal plasma and incubation period on cold shock susceptibility of boar spermatozoa. *J Anim Sci*, v.37, p.528-531, 1973.

Rebolledo AD, Sierra LN, Tamayo AC, Loria AA, Denis SE, Oses RB, Parra EG, Monsreal LP, Ugalde JR. Fertility in hair sheep inseminated with freeze spermatozoa rediluted with seminal plasma. *Rev Cient Fac Cienc Vet*, v.17, p.73-76, 2007.

Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.77-111, 2000.

Yeni D, Gundogan M, Cigerci IH, Avdatek F, Fidan AF. Seasonal variation of oxidative stress parameters in ram seminal plasma. *J Anim Vet Adv*, v.9, p.49-54, 2010.

Yue WB, Shi L, Bai ZM, Ren YS, Zhao YY. Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of ram seminal plasma proteins and their correlation with semen characteristics. *Anim Reprod Sci*, v.116, p.386-391, 2009.
