

¿Es posible mejorar la fertilidad del semen ovino criopreservado mediante la adición de plasma seminal?

Ledesma, A.⁽¹⁾, Manes, J.⁽²⁾, Alberio, R.⁽²⁾, Hozbor, F.⁽²⁾

Resumen

El objetivo de este artículo es proporcionar una revisión actualizada del rol del plasma seminal y de sus componentes proteicos sobre la capacidad fecundante del semen ovino criopreservado. En la especie ovina la inseminación artificial se realiza principalmente por la vía cervical mediante el uso de semen fresco/refrigerado, ya que el empleo de semen congelado/descongelado por la misma vía genera bajos porcentajes de preñez. Con el propósito de mejorar la calidad espermática posdescongelación y alcanzar tasas de preñez similares a las obtenidas con semen fresco se han desarrollado numerosos estudios relacionados al efecto del plasma seminal sobre la calidad y funcionalidad espermática. Los resultados de las investigaciones han demostrado que el plasma seminal y sus proteínas de bajo peso molecular son capaces de mejorar parámetros cualitativos de los espermatozoides criopreservados. Sin embargo, los estudios sobre el efecto del plasma seminal en la funcionalidad espermática siguen siendo contradictorios.

Palabras clave: semen criopreservado; plasma seminal; ovino.

Does seminal plasma improves the fertility of cryopreserved ram semen?

Summary

The aim of the present article is to provide an updated review about the role of seminal plasma and its protein components on the fertilizing capacity of cryopreserved ram semen. Artificial insemination in sheep is performed cervically using fresh/refrigerated semen since the use of frozen/thawed by the same trial causes low pregnancy rates. With the objective of improving sperm postthawing quality and reach pregnancy rates similar to those obtained with fresh semen, seminal plasma has been the subject of numerous studies. Research results have shown that seminal plasma and their low molecular weight proteins are able to improve qualitative parameters of ram cryopreserved sperm. However, studies on the effect of PS on sperm function remaining contradictory.

Key words: cryopreserved semen; seminal plasma; ovine.

(1) Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata.
Ruta 226 Km 73.5 (CP 7620), Balcarce, Argentina.

albaledesma@hotmail.com.ar

(2) Biotecnología de la Reproducción, Instituto Nacional de Tecnología
Agropecuaria. INTA Balcarce.

Recibido: 18 de junio de 2013.

Aceptado: 9 de agosto de 2013.

Taurus Año 15 N° 59: 16-21

1. Introducción.
 2. Factores que limitan la inseminación artificial con semen congelado/descongelado por vía cervical.
 - 2.1. Anatomía del cérvix de la oveja.
 - 2.2. Reducción de la viabilidad y de la capacidad fecundante de los espermatozoides ovíos congelados/descongelados.
 3. Calidad seminal y métodos de colecta.
 4. Plasma seminal y efecto de su adición a los espermatozoides criopreservados.
 5. Conclusión.
 6. Bibliografía.
-

1. Introducción

La criopreservación de semen es una herramienta biotecnológica que permite la preservación de genes de importancia para su uso futuro, facilita el transporte de gametas a través de largas distancias, permite que un gran número de hembras puedan ser inseminadas en diferentes momentos del año y proporciona un seguro contra la pérdida de un reproductor en particular ⁽²⁰⁾. Esta herramienta ha tenido su mayor impacto en los programas de mejoramiento genético de la especie bovina, a través de su uso combinado con la inseminación artificial (IA). Las elevadas tasas de preñez obtenidas y la practicidad de la técnica, que permite depositar el semen directamente en el útero, han posibilitado su rápido desarrollo e implementación. Sin embargo, en la especie ovina el uso masivo de la IA se limita a la aplicación de semen fresco/refrigerado por la vía cervical, ya que el empleo de semen congelado/descongelado por la misma vía genera porcentajes de preñez que no superan el 30% ⁽²⁸⁾. Estos bajos resultados se deben principalmente a dos factores, por un lado, a la compleja anatomía del cérvix de la oveja que, a diferencia de lo mencionado en bovinos, impide la descarga del semen directamente en la luz uterina. Por otro lado, como consecuencia de los procesos de congelación y descongelación, la vida media de los espermatozoides se ve reducida y su capacidad fecundante alterada.

2. Factores que limitan la inseminación artificial con semen congelado/descongelado por vía cervical

2.1. Anatomía del cérvix de la oveja

El cuello uterino (cérvix) es un órgano fibroso, muy largo y estrecho compuesto por tejido conectivo, una capa serosa exterior y epitelio luminal ^(21, 24). Su conformación anatómica en ovíos difiere de las demás especies. Internamente este órgano es muy tortuoso debido a la presencia de anillos que se proyectan hacia el lumen disminuyendo el diámetro de su luz ^(21, 32). Además, el ostium o abertura de cada anillo es muy pequeño (~2,7 mm) y no se encuentra alineado concéntricamente con el del anillo adyacente. Esto hace que el paso de los catéteres de inseminación convencionales y, en consecuencia, la descarga del semen dentro del útero sea muy difícil. Asimismo, existe una gran variabilidad de las características cervicales entre las diferentes razas e incluso entre individuos de la misma raza, tanto en la longitud del cérvix (5-10 cm), en el número de anillos (3-7), en el diámetro del ostium (1-3 mm) y en la distancia entre anillos (3-5 cm) ^(21, 24), por lo que resulta casi imposible la creación de un catéter de inseminación universal para la especie ovina. En el año 1982 Killen y Caffery ⁽²⁵⁾ perfeccionaron en Australia la técnica de inseminación vía laparoscópica. Esta práctica consiste en la descarga de semen congelado/descongelado directamente dentro del útero de la oveja, logrando sortear la barrera que supone el cérvix uterino. Su ventaja principal es la obtención de altos valores de preñez (60-70%). Sin embargo, presenta varias dificultades como el estrés que provoca en los animales debido a su invasividad, sus elevados costos y la necesidad de contar con personal calificado y equipamiento especializado ⁽¹⁴⁾.

2.2. Reducción de la viabilidad y de la capacidad fecundante de los espermatozoides ovinos congelados/ descongelados

La criopreservación de semen involucra la interrupción temporal del metabolismo de las células espermáticas expuestas a bajas temperaturas, con el objetivo de prolongar su vida media y funcionalidad, desde la eyaculación hasta el momento de la inseminación o fecundación ⁽⁴¹⁾. Sin embargo, aun utilizando el mejor protocolo de criopreservación, alrededor de la mitad de la población espermática inicial no sobrevive a este proceso y aproximadamente el 30% de la población que sobrevive sufre daños subletales que alteran su funcionalidad ⁽²⁸⁾. La sensibilidad espermática a los daños ocasionados por las bajas temperaturas difiere entre especies, siendo mayor en ovinos que en bovinos y humanos ⁽²²⁾. Se ha demostrado que esto responde, en parte, a la composición lipídica de sus membranas plasmáticas, ya que una mayor relación ácidos grasos poliinsaturados (fosfolípidos)/saturados (colesterol) da lugar a una membrana plasmática más compacta y permeable, con la consiguiente mayor resistencia a los daños ocasionados por la criopreservación (bovinos y humanos) ⁽¹⁷⁾.

En ovinos, la población espermática que sobrevive a la criopreservación muestra un detrimiento en la movilidad y reducción del avance a través del tracto reproductivo de la hembra, lo cual ha sido asociado a la disminución de la actividad respiratoria ⁽²⁰⁾. El procesamiento de semen ocasiona, además, la pérdida de moléculas de superficie espermática, que conduce a un aumento de la permeabilidad de las membranas similar al ocurrido durante la capacitación espermática (CE), por lo que ha sido denominada “criocapacitación” ⁽⁶⁾. Los espermatozoides criocapacitados adquieren de manera anticipada la capacidad de fecundar al ovocito a la vez que se reduce su vida media. Esta CE prematura compromete la fecundación en los programas de inseminación ⁽³⁸⁾.

La CE es un fenómeno fisiológico por el cual los espermatozoides recién eyaculados adquieren la capacidad de fecundar al ovocito ⁽⁴⁾. Este fenómeno ocurre a lo largo del tracto reproductor femenino a través de un conjunto de eventos moleculares y fisiológicos que alteran la estabilidad y permeabilidad de la membrana celular ⁽¹¹⁾. Volgmayr y Sawyer ⁽³⁷⁾ sugirieron que la CE, en el

espermatozoide ovino, implica la pérdida de proteínas específicas situadas en la superficie de la membrana plasmática, así como también la adsorción selectiva de componentes de los fluidos uterinos. Una vez ocurrida la CE se da lugar a la reacción acrosómica (RA). Ésta se caracteriza por la fusión de la membrana plasmática y acrosomal externa, con la consiguiente liberación de enzimas acrosomales necesarias para atravesar las barreras ovocitarias. Estos eventos fisiológicos (CE y RA) están encadenados y finalizan con la fecundación del ovocito o con la muerte del espermatozoide. Por lo tanto, si ocurren de manera anticipada, se producirá una asincronía con el momento de la ovulación, comprometiéndose la fertilización ⁽³⁹⁾.

En el semen recién eyaculado, coexisten subpoblaciones espermáticas con diferentes estados de maduración y capacitación, lo que permite contar con espermatozoides en condiciones de fecundar al ovocito luego de la ovulación durante un amplio rango de tiempo ⁽¹⁾. Los procesos de congelación y descongelación generan poblaciones espermáticas más homogéneas que sólo son capaces de alcanzar la fecundación en un espacio temporal más estrecho ⁽²⁾, lo cual explica, en parte, los bajos porcentajes de preñez obtenidos en los programas de IA cuando se usa semen congelado/descongelado por vía cervical.

3. Calidad seminal y métodos de colecta

La calidad seminal del eyaculado varía entre individuos, entre eyaculados del mismo individuo, con la estación del año y con el método de colecta de semen utilizado, condicionando la respuesta a la criopreservación. En la especie ovina las técnicas de colecta seminal de uso más difundido son la vagina artificial (VA) y la electroeyaculación (EE). La VA es un método que se asemeja al servicio natural y de fácil aplicación, pero que requiere de un período previo de entrenamiento de los animales. Este período puede variar desde pocos días a varios meses según el reproductor ⁽³⁶⁾. La otra modalidad es el uso de la EE, que permite obtener semen de un mayor número de animales en poco tiempo y que, al independizarnos de la voluntad del animal para realizar la monta, resuelve las desventajas mencionadas para la VA ⁽¹⁹⁾. La EE ejerce su acción estimulante directamente sobre los nervios pélvicos simpáti-

cos y parasimpáticos y sobre las glándulas anexas del aparato reproductor, incrementando la proporción de plasma seminal (PS) y reduciendo, a su vez, la concentración espermática del eyaculado^(5, 23). Sin embargo, observaciones realizadas en nuestro grupo de trabajo mostraron que tanto el volumen como la concentración de los eyaculados obtenidos con EE pueden ser controlados mediante ajustes en la duración, la intensidad del estímulo y la colecta selectiva de las fracciones del eyaculado (PS y espermatozoides)⁽²⁶⁾. Es decir que, un buen ajuste del método (tiempo de estimulación-relajación y momento de obtención) según el individuo, permite obtener eyaculados cuantitativamente similares a los obtenidos con VA.

4. Plasma seminal y efecto de su adición a los espermatozoides criopreservados

El PS es un fluido corporal compuesto por secreciones de las glándulas anexas del aparato reproductor (vesículas seminales, próstata y glándulas bulbouretrales) y en menor medida por fluido epididimario. Durante la eyaculación se mezcla con los espermatozoides, aumentando el volumen del eyaculado y facilitando su tránsito por el tracto reproductor⁽³⁰⁾. Está compuesto por agua, electrolitos, proteínas, lípidos y ácidos orgánicos⁽⁷⁾. La concentración de algunos de estos componentes varía a lo largo del año, en relación a la estacionalidad reproductiva de la especie. El PS activa a los espermatozoides previamente inmóviles, proporciona un medio rico en nutrientes, actúa como medio natural para completar la maduración espermática⁽³⁵⁾ y regula la interacción del espermatozoide con el tracto genital de la hembra a través de su acción inmunosupresora⁽⁴⁰⁾.

A partir de los estudios realizados por Bedford y Chang⁽⁹⁾ en eyaculados frescos de conejo, se determinó que el PS podía revertir los cambios generados por la CE y como consecuencia de ello, prolongar la vida media y la funcionalidad del espermatozoide. Así surgió la hipótesis que la resuspensión de espermatozoides congelados/descongelados en PS podría revertir los cambios ocasionados por la congelación (criocapacitación). El agregado de PS al medio de descongelación tuvo un efecto favorable en la estabilización e integridad de las membranas plasmáticas y acrosomales y permitió mejorar las tasas de movilidad espermática en ovinos^(18, 28).

Aumüller y col.⁽³⁾ y Chandonnet y col.⁽¹⁶⁾ determinaron que los efectos benéficos del PS se debían principalmente a sus componentes de naturaleza proteica, los cuales en su mayoría son secretados por las vesículas seminales⁽²⁷⁾. En estudios posteriores se observó que el agregado de las proteínas del PS al medio de descongelación fue capaz de revertir los efectos perjudiciales de la exposición a bajas temperaturas, recuperando la permeabilidad de las células intactas⁽⁸⁾. Asimismo, el agregado de las mismas proteínas en el medio de congelación fue capaz de prevenir los efectos de la criopreservación en las membranas espermáticas, manteniendo la viabilidad espermática⁽³⁴⁾. Se ha demostrado, que la capacidad de las proteínas del PS es dependiente de su concentración⁽³⁴⁾. Domínguez y col.⁽¹⁸⁾, en un estudio llevado adelante en nuestro laboratorio, determinaron que la composición proteica del PS difiere según la estación del año, siendo el PS colectado en otoño el que posee la mayor capacidad de revertir los daños antes mencionados, en coincidencia con lo reportado por Cardozo y col.⁽¹⁵⁾. Este efecto fue relacionado tanto a la presencia de una mayor concentración de proteínas totales en el PS, como a una diferencia en su perfil proteico. Barrios y col.⁽⁸⁾ y Pérez-Pé y col.⁽³⁴⁾ hallaron dos proteínas de bajo peso molecular (14 y 20 kD) denominadas RSVP-14 y RSVP-20 (de sus siglas en inglés *ram seminal vesicles proteins*), las cuales serían las principales responsables de proteger a los espermatozoides de los daños ocasionados por la criopreservación, así como de preservar la integridad de las membranas plasmáticas. Sin embargo, su mecanismo de acción continúa siendo desconocido. Nuestro grupo de trabajo, a través de las investigaciones realizadas por Bernardini y col.⁽¹³⁾, desarrolló un método que permitió identificar un grupo de proteínas del PS que tiene la capacidad de interactuar con los componentes de la membrana plasmática de espermatozoides criopreservados. Estas proteínas, identificadas como lactotransferrin, epididymal secretory protein E1, Synaptosomal-associated protein 29 (SNAP-29) y RSVP-20, demostraron ser capaces de mejorar la movilidad y la ultraestructura mitocondrial de los espermatozoides sometidos a los procesos de congelación y descongelación. SNAP-29 y RSVP-20 representan el 30% del contenido total de proteínas del PS ovino, y han sido halladas también en PS

de bovino, aunque se le han atribuido funciones diferentes⁽¹²⁾.

A pesar de los resultados obtenidos *in vitro*, los estudios de fertilidad *in vivo* con semen congelado/descongelado tratados con PS son escasos y contradictorios. El agregado de 20% de PS a espermatozoides congelados/descongelados y depositados en el cuello uterino, posibilitó la obtención de tasas de gestación similares a las que se pueden obtener con semen fresco (50-60%)^(10, 28, 29). Sin embargo, O' Meara y col.⁽³³⁾ no hallaron diferencias en los porcentajes de preñez en hembras inseminadas vía cervical con semen criopreservado tratado con PS (Tabla 1). Estos autores postularon que la diferencia observada podría deberse a los métodos de preparación y selección espermática utilizados. Los trabajos en los cuales se reportó un efecto positivo sobre las tasas de preñez, emplearon en la inseminación artificial únicamente la población de espermatozoides móviles. Estas gametas fueron obtenidas a través de un procedimiento que implica, no sólo la eliminación de los espermatozoides inmóviles, sino también la eliminación parcial o total del diluyente, facilitando de esta manera que las moléculas del PS interactúen con la membrana plasmática de los espermatozoides. Por otro lado, no debemos descartar que las diferencias en la composición del PS modifiquen su efecto sobre los espermatozoides criopreservados, y de esta manera ser las causantes de las discrepancias en los resultados reportados⁽³¹⁾.

Tabla 1. Porcentaje de fertilidad en ovejas inseminadas por vía cervical con semen ovino congelado / descongelado al que se le agregó plasma seminal (PS).

PS (%)	Momento de adición de PS	n	Porcentaje de preñez	Referencia Bibliográfica
20 0 (control)	LD	92	51 ^a	Maxwell y col. (1999)
		94	28 ^b	
50 0 (control)	AC	30	86,6	Belibasaki y col. (2000)
		30	76,6	
20 0 (control)	LD	72	31,4	O' Meara y col. (2007)
		73	17,4	

Referencias: LD: Luego de la descongelación, AC: Antes de la congelación. Dentro de cada trabajo, letras diferentes indican diferencias significativas (P<0,05).

5. Conclusión

La aplicación de PS en la criopreservación de semen ha sido objeto de muchas investigaciones alrededor del mundo. Sin embargo, aunque se

han logrado grandes avances en el estudio del rol del PS sobre la fisiología espermática, hasta el momento no es posible concluir acerca de los efectos de su adición al semen criopreservado sobre la fertilidad debido a la inconsistencia en los resultados reportados. Esta inconsistencia ha sido atribuida tanto a los procedimientos de selección espermática utilizados como a las diferencias en la composición del PS. El aislamiento e identificación de las proteínas del PS con efecto crioprotector posibilitaría la creación de un diluyente que proteja de los daños ocasionados por la congelación/descongelación, permitiendo hacer más eficiente el uso de esta biotecnología.

6. Bibliografía

1. Abaigar, T., Holt, W., Harrison, R., Del Barrio, G. 1999. Sperm subpopulations in boar and gazelle semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 60, 32-41.
2. Amann, R., Hammerstedt, R. 1993. In vitro evaluation of sperm quality: an option. *J. Androl.* 14, 397-406.
3. Aumüller, G., Vesper, M., Seitz, J., Kemme, M., Scheit, K. 1988. Binding of a major secretory protein from bull seminal vesicles to bovine spermatozoa. *Cell Tissue Res.* 252, 377-384.
4. Austin, C. 1951. Observations on the penetration of the sperm into the mammalian egg. *Aust. J. Sci. Res.* 4, 581-592.
5. Austin, J., Hupp, E., Murphree, R. 1961. Comparison of quality of bull semen collected in the artificial vagina and by electroejaculation. *J. Dai Sci.* 44, 292-297.
6. Bailey J., Morrier, A., Cormier, N. 2003. Semen cryopreservation: Successes and persistent problems in farm species. *Can. J. Anim. Sci.* 3, 393-401.
7. Barrios, B., Fernández-Juan, M., Cebrián-Pérez, J., Muiño-Blanco, T. 2002. Identificación de una nueva proteína del plasma seminal que protege a los espermatozoides frente al daño del frío. *Actas 10 Jornadas sobre Producción Animal. ITEA* 1. 2002.
8. Barrios, B., Pérez-Pé, R., Gallego, M., Tatoo, A., Osada, J., Muiño-Blanco, T., Cebrián-Pérez, J. 2000. Seminal plasma proteins revert the cold-shock damage on ram sperm membrane. *Biol. Reprod.* 63, 1531-1537.
9. Bedford, J., Chang, M. 1961. Removal of capacitation factor from seminal plasma by high-speed centrifugation. *Am. J. Physiol.* 202, 179-181.
10. Belibasaki, S., Amiridis, G., Lymberopoulos, A., Varsakeli, S., Kouskoura, T. 2000. Ram seminal plasma and fertility: Results from an ongoing field study. *Acta Vet Hung.* 48, 335-341.
11. Benoff, S. 1993. Preliminaries to fertilization: the role of cholesterol during capacitation of human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 8, 2001.
12. Bergeron, A., Villemure, M., Lazure, C., Manjunath, P. 2005. Isolation and characterization of the major proteins of ram seminal plasma. *Mol. Rep. Dev.* 71, 461-470.

13. Bernardini, A., Hozbor, F., Sánchez, E., Fornes, M., Alberio, R., Cesari, A. 2011. Conserved ram seminal plasma proteins bind to the sperm membrane and repair cryopreservation damage. *Theriogenology*. 76,436-447.
14. Candappa, I., Bartlewski, P. 2011. A review of advances in artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) in sheep, with the special reference to hormonal induction of cervical dilatation and its implications for controlled animal reproduction and surgical techniques. *The open Reproduct Sci J*. 3, 162-175.
15. Cardozo, J., Ferrández-Juan, M., Forcada, F., Abecia, A., Muñoz-Blanco, T. 2006. Monthly variations in ovine seminal plasma proteins analyzed by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Theriogenology*. 66, 841-850.
16. Chandonnet, L., Roberts, K., Chapdelaine, A. Manjunath, P. 1990. Identification of heparin-binding proteins in bovine seminal plasma. *Mol. Reprod. Dev.* 26,313-318.
17. Darin-Bennett, A., White, I. 1975. Cholesterol and phospholipid content of mammalian spermatozoa and its relation to membrane structure and cold-shock. *J. Reprod. Fertil.* 2, 383-384.
18. Dominguez, M., Falcinelli, A., Hozbor, F. Sanchez, E. Cesari, A., Alberio, R. 2008. Seasonal variations in the composition of ram seminal plasma and its effect on frozen-thawed ram sperm. *Theriogenology*. 69,564-573.
19. Foote, R.H. 2002. The history of artificial insemination: Selected notes and notables. *J. Anim. Sci.* 80, 1-10.
20. Gillan, L., Maxwell, W., Evans, G. 2004. Preservation and evaluation of semen for artificial insemination. *Rep. Fert. Dev.* 16, 447-454.
21. Halbert, G., Dobson, H., Walton, J., Buckrell, B. 1990. A technique for transcervical intrauterine insemination of ewes. *Theriogenology*. 33, 993-1010.
22. Holt, W.M., North, R.D. 1984. Partially irreversible cold-induced lipid phase transitions in mammalian sperm plasma membrane domains: freeze-fracture study. *J. Exp. Zool.* 230,473-483.
23. Hulet, C., Foote, W., Blackwell, R. 1964. Effects of natural and electrical ejaculation on predicting fertility in the ram. *J. Anim. Sci.* 23,418-424.
24. Kershaw, C., Khalid, M., McGowan, M., Ingram, K. 2005. The anatomy of the sheep cervix and its influence on the transcervical passage of an inseminating pipette into the uterine lumen. *Theriogenology*. 64, 1225-1235.
25. Killen, I., Caffery, G. 1982. Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. *Aust Vet J*. 59, 95-100.
26. Ledesma, A. 2012. Efecto del método de colecta de semen y de plasma seminal sobre la supervivencia pos-descongelación de espermatozoides ovinos. Tesis Magíster Scientiae. Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata. Balcarce, Argentina. 120p.
27. Mann, T., Lutwak-Mann, C. 1981. Male reproductive function and semen. Themes and trends in physiology, biochemistry and investigative andrology. Berlín: Springer-Verlag. 495 pp.
28. Maxwell, W. M. C., Evans, G., Mortimer, S., Gillan, L., Gellaltly, E., McPhie, C. 1999. Normal fertility in ewes after cervical insemination with frozen-thawed spermatozoa supplemented with seminal plasma. *Reprod. Fert. Dev.* 11,123-126.
29. McPhie, C., Evans, G., Maxwell, W.M.C. 2000. Effect of supplementation of fresh and frozen-thawed semen with seminal plasma on fertility of ewes after cervical and intrauterine insemination. 14 International Congress on Animal Reproduction. Stockholm 2.
30. Moura, A., Chapman, D., Koc, H., Killian, G. 2006. Proteins of the cauda epididymal fluid associated with fertility of mature dairy bulls. *J. Androl.* 27,534-541.
31. Muñoz-Blanco, R., Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J. 2008. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod. Domest. Anim.* 43, 18-31.
32. Naqvi, S., Joshi, A., Bag, S., Pareek, S., Mittal, J. 1998. Cervical penetration and transcervical AI of tropical sheep (Malpura) at natural estrus using frozen thawed ram semen. *Small Ruminant Res.* 29, 329-333.
33. O'Meara, C., Donovan, A., Hanrahan, J., Duffy, P., Fair, S., Evans, A., Lonergan, P. 2007. Resuspending ram spermatozoa in seminal plasma after cryopreservation does not improve pregnancy rate in cervically inseminated ewes. *Theriogenology*. 67,1262-1268.
34. Pérez-Pé, R., Cebrián-Pérez, J., Muñoz-Blanco, T. 2001. Semen plasma proteins prevent cold-shock membrane damage to ram spermatozoa. *Theriogenology*. 56,425-434.
35. Saling, P. 1989. Mammalian sperm interaction with extracellular matrices of the egg. In: Milligan SR eds. Oxford Reviews of Reproductive Biology. New York: Oxford University Press. pp 339-388.
36. Terrill, C. Comparison of ram semen collection obtained by three different methods for artificial insemination. *Proc Erd Annu Mtg Am Soc Anim Prod.* Chicago, IL. 1940. pp 201-207.
37. Volgmayr, J.K., Sawyer, R.F. 1986. Surface transformation of ram spermatozoa in uterine, oviduct and cauda epididymal fluids in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 78,315-325.
38. Watson, P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7,871-891.
39. Yanagimachi, R. 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 3,371-372.
40. Yeung W Lee, K., Koistinen, H., Seppala, M., Ho, P. 2006. Roles of glycodeolin in modulating sperm function. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250,149-56.
41. Yoshida, M. 2000. Conservation of sperms: current status and new trends. *Anim. Reprod. Sci.* 60,349-355.