

Efeito da adição do tanino ao meio de refrigeração de sêmen ovino

Rayssa do Nascimento Souza¹, Raquel Fortunato Cunha Ramos¹, Andreia Fernandes de Souza², Raquel Desenzi³, Jéssica Martins de Andrade¹, Sandra Silva Duarte¹, Rafael Artur da Silva Júnior^{1,2*}.

¹ *Bacharelado em Medicina Veterinária, Centro Universitário Brasileiro (UNIBRA), Recife- Brasil.*

² *Setor de Ovinos, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-Brasil.*

³ *Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Reprodução (LBR), Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Recife-Brasil.*

(*Autor correspondente: rafael.artur@grupounibra.com)

Histórico do Artigo: Submetido em: 03/01/2024 – Revisado em: 15/03/2024 – Aceito em: 11/04/2024

RESUMO

A expansão dos mercados interno e externo de carnes e peles ovina tem impulsionado o aumento populacional e da qualidade genética dos rebanhos. A utilização da Inseminação Artificial encontra obstáculos nas baixas taxas de prenhez com aumento do custo relacionado à técnica, especialmente à inseminação artificial cervical com sêmen refrigerado, pois a criopreservação provoca danos aos espermatozoides. A adição de antioxidantes aos meios diluentes de sêmen resfriado vem se mostrando uma alternativa viável para a manutenção da qualidade do sêmen após o descongelamento. Objetiva-se avaliar o efeito do uso do tanino em meio diluente usados na criopreservação de sêmen ovino. Para tanto, o sêmen foi coletado de machos ovinos e seguidamente foram submetidos a análise, formação de um pool e fracionados em quatro tratamentos distintos com quatro níveis de adição de tanino (0, 100, 10 e 1 mg/mL) ao diluente (tris-gema). Após, as amostras seguiram para o resfriamento (5 °C), após o descongelamento foram avaliados quanto aos parâmetros de motilidade espermática e integridade acrossomal com 24, 48 e 72 horas após o resfriamento. O grupo com adição de 10 mg/mL de tanino ao diluidor apresentou média de motilidade significativamente maior quando comparada aos outros grupos e todos os grupos apresentaram integridade acrossomal acima dos 90% em todos os momentos avaliados. Podemos concluir que a adição de 10mg/mL de Tanino ao meio de diluição para refrigeração de sêmen ovino preserva a motilidade espermática em até 48 horas resfriado, tornando seu uso uma alternativa viável para a refrigeração de sêmen ovino.

Palavras-Chaves: Criopreservação, antioxidante, inseminação artificial, pequenos ruminantes.

Effect of adding tannin to the medium for cooling sheep semen.

ABSTRACT

The expansion of domestic and international markets for sheep meat and skins has driven the increase in population and genetic quality of herds. The use of Artificial Insemination faces obstacles due to low pregnancy rates and increased costs associated with the technique, especially cervical artificial insemination with chilled semen, as cryopreservation causes damage to sperm. The addition of antioxidants to chilled semen extender media has proven to be a viable alternative for maintaining sperm quality after thawing. The objective is to evaluate the effect of using tannin in the extender media used in the cryopreservation of sheep semen. For this purpose, semen was collected from male sheep, analyzed, pooled, and divided into four different treatments with four levels of tannin addition (0, 100, 10, and 1 mg/mL) to the extender (tris-yolk). Afterward, the samples underwent cooling (5 °C), and after thawing, they were evaluated for sperm motility and acrosomal integrity parameters at 24, 48, and 72 hours after cooling. The group with the addition of 10 mg/mL of tannin to the extender showed significantly higher motility compared to other groups, and all groups exhibited acrosomal integrity above 90% at all evaluated time points. In conclusion, the addition of 10 mg/mL of tannin to the dilution medium for cooling sheep semen preserves sperm motility for up to 48 hours, making it a viable alternative for sheep semen refrigeration.

Keywords: Cryopreservation, antioxidant, artificial insemination, small ruminants.

Souza RN, Ramos RFC, Souza AF, Desenzi R, Andrade JM, Duarte SS, Silva Júnior RA. Efeito da adição do tanino ao meio de refrigeração de sêmen ovino. *Revista Universitária Brasileira*. 2024;2(1):93 – 101.



1. Introdução

Sendo a caprino-ovinocultura uma atividade pecuária importante para geração de crescimento econômico na região semi-árida do estado de Pernambuco. Entretanto, a maioria dos criatórios é de subsistência familiar, caracterizados pelo baixo desempenho produtivo devido à adoção do sistema extensivo de criação. Esse sistema dificulta o controle dos recursos disponíveis e a adoção de práticas produtivas eficientes, assim limitando a produtividade e a regularidade na oferta desses animais¹.

Porém, nas últimas décadas a caprino-ovinocultura tem passado por transformações na sua cadeia produtiva, estimuladas pela expansão dos mercados interno e externo de carnes e peles dessas espécies. Essa tendência vem impulsionando o aumento populacional e a qualidade genética dos rebanhos, além de um consequente estímulo a competitividade, o que vem pressionando os criadores a adotarem tecnologias que sejam técnica e economicamente viáveis^{1,2}.

Objetivando a manutenção da viabilidade espermática por períodos maiores, a criopreservação é amplamente empregada associada à técnica de Inseminação Artificial. A duração e a temperatura da estocagem, bem como a natureza do diluente empregado são fatores importantes na efetividade da técnica, já que afetam significativamente a taxa de fertilidade do sêmen criopreservado³.

O processo de criopreservação pode ser dividido basicamente em duas etapas: a refrigeração, que consiste na redução da temperatura seminal a partir da temperatura ambiente a valores acima de 0 °C; e a congelamento, que consiste na redução da temperatura seminal a valores negativos a partir de 0 °C⁴. No entanto, a conservação pelo frio, pode provocar danos ultraestruturais, bioquímicos e funcionais nas células espermáticas⁵.

Não obstante, o estresse oxidativo também se destaca como um dos principais fatores que influenciam na viabilidade do sêmen criopreservado. Já que a criopreservação é um processo estressante para célula espermática, pois provoca a redução da integridade da membrana e principalmente da motilidade progressiva dos espermatozoides⁶.

Durante o processo de criopreservação ocorre a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), envolvidas em mecanismos que levam a diminuição da fertilidade do sêmen⁷. Embora as ROS sejam produtos intermediários gerados pelo processo de obtenção de energia indispensável para a manutenção das funções fisiológicas dos espermatozoides⁸, sua elevada elaboração pode ocasionar sérios danos à célula espermática, levando à peroxidação lipídica dos ácidos graxos da membrana celular, provocando perda de função e morte espermática^{7,8}.

Neste contexto, a adição de antioxidantes aos meios diluentes de sêmen criopreservado vem se mostrando uma alternativa viável no que tange o combate dos danos oxidativos inerentes a criopreservação, com vistas ao aumento da qualidade e da capacidade de fertilização do sêmen após o descongelamento⁹.

O tanino (TA), é um poderoso antioxidante e, portanto, exibe várias propriedades farmacológicas, como habilidades antitóxicas, anticancerígenas, antialérgicas, antivirais e antibacterianas¹⁰. Além disso, a oportunidade de explorar substâncias fitogênicas, por exemplo, taninos, ganhou atenção na nutrição dos rebanhos como alternativas naturais de aditivos alimentares à antibióticos para melhorar o desempenho produtivo e reprodutivo do rebanho¹¹. No entanto, os mecanismos moleculares subjacentes do TA não são claros e há informações limitadas sobre os efeitos do TA na reprodução e, especialmente, seus efeitos em células espermáticas submetidas ao processo de criopreservação.

Diante do exposto, este projeto tem por objetivo avaliar o uso do tanino em meios diluentes usados na criopreservação de sêmen de caprinos e ovinos com vistas ao desenvolvimento de meios diluentes mais eficientes. Para tanto, será investigada a capacidade destas substâncias em proteger os espermatozoides dos danos causados pelo estresse oxidativo durante o processo de resfriamento e aquecimento, a fim de aumentar a viabilidade do uso de sêmen refrigerado de pequenos ruminantes nos programas de inseminação artificial

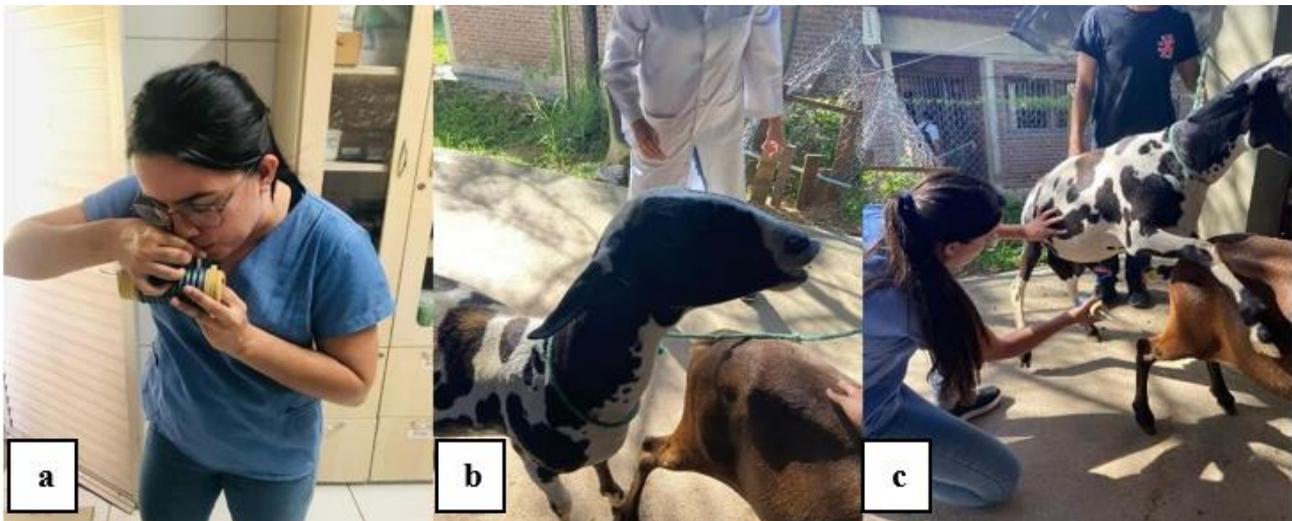
destas espécies.

2. Material e Métodos

O experimento foi realizado na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) nos Departamentos de Zootecnia e Medicina Veterinária. Os animais foram selecionados a partir dos critérios de seleção de idade (entre 2 e 4 anos) e com bom histórico de fertilidade, sendo utilizados no total 2 animais ovinos machos, da raça Santa Inês.

Os animais foram submetidos à coleta de sêmen semanalmente, utilizando-se o método de vagina artificial e uma fêmea como manequim (Figura 1), totalizando quatro coletas viáveis por animal. Após a coleta, os ejaculados foram acondicionados em banho-maria à 37°C e avaliados quanto aos aspectos físicos (volume do ejaculado; aspecto, turbilhonamento espermático, motilidade espermática progressiva, vigor espermático, concentração espermática por mL e total) e morfológicos em microscopia óptica, segundo os padrões preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal¹².

Figura 1 – Coleta de sêmen ovino.
Figure 1 – Collection of sheep semen.

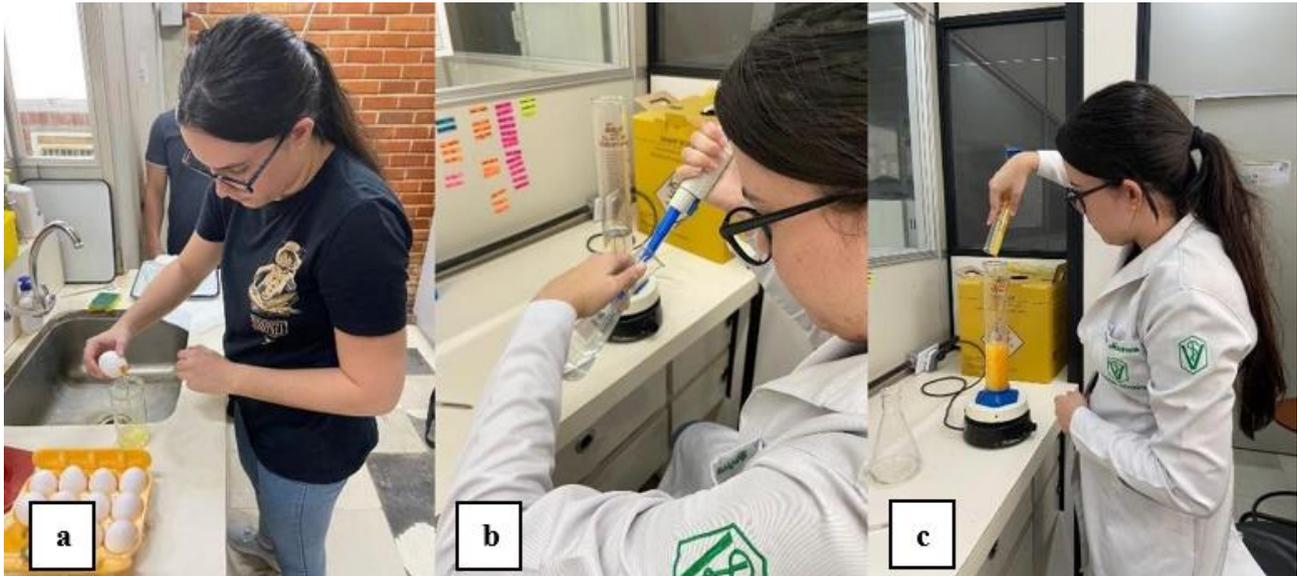


a) preparação da vagina artificial para pequenos ruminantes; b) Reflexo de fleming do macho, indica boa libido; c) coleta do sêmen.

a) preparation of the artificial vagina for small ruminants; b) Male fleming reflex, indicates good libido; c) semen collection.

O diluidor a base de Tris-gema foi preparada em duas etapas (Figura 2), inicialmente foi diluído TRIS-hidroximetilaminometano, Ácido cítrico e Frutose em água destilada, o pH foi corrigido para 6,8 e posteriormente adicionado a uma solução com 20% de gema de ovo (Proveniente de galinhas adquiridos em supermercado). Após a preparação do diluidor, foi centrifugado e filtrado em filtro de seringa e armazenado em freezer horizontal a uma temperatura de -20 °C, no dia da coleta e diluição, uma amostra do diluidor era descongelada para a sua utilização.

Figura 2 – Preparação do diluidor a base de Tris-Gema.
 Figure 2 – Preparation of the Tris-Gem-based extender.



- a) Gema de ovo de galinha sendo separada e filtrada; b) Preparação da fração tris; c) Preparação final do diluidor a base de tris-gema.
 a) Chicken egg yolk being separated and filtered; b) Preparation of the tris fraction; c) Final preparation of the tris-gem-based extender.

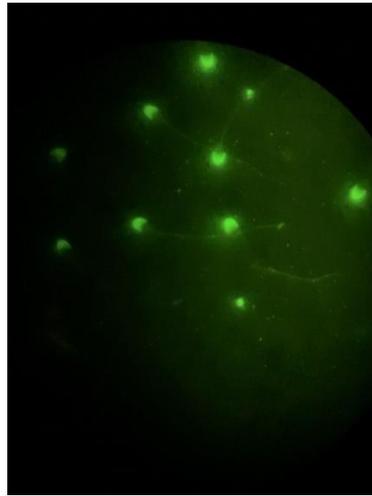
Os ejaculados que atingiram os valores mínimos preconizados pelo CBRA (2013) foram submetidos à formação de um pool e em seguida diluídos com diluidor preparado para sêmen ovino. A diluição final foi ajustada para obtenção de 20 milhões de espermatozoides por mL. As amostras foram divididas em quatro grupos distintos com diferentes concentrações de Tanino adicionado ao diluente (T0 = 0; T1 = 100; T2 = 10 e T3 = 1 mg/mL). Em seguida as amostras de sêmen diluído foram acondicionadas em refrigerador vertical a uma temperatura de 5°C pelo período máximo de 72 horas.

A análise da motilidade espermática, pós descongelação, foi determinada pelo percentual de células móveis identificadas no campo do microscópio, com escala entre 0 a 100%. Essa avaliação foi sempre realizada por um único técnico totalmente às cegas. Já a análise de integridade do acrossoma foi realizada em microscopia de epifluorescência (Carl Zeiss, Alemanha). Todos os grupos foram avaliados após 24h, 48h e 72h de refrigeração.

Para análise de Integridade do Acrossoma, foi utilizada a sonda Isotiocianato de Fluoresceína conjugado com *Arachis hypogaea* agglutinin (PNA) (FITC-PNA; Sigma Aldrich®)¹³. Uma alíquota (10 µL) foi usada para fazer um estirado da amostra e as lâminas foram coradas com alíquotas de 20 µL de FITC-PNA, posteriormente incubadas em câmara úmida a 4°C por 15 min na ausência de luz. Em seguida, as lâminas foram imersas em PBS duas vezes e secas ao ar. Imediatamente antes da avaliação, 5,0 µL da solução (4,5 mL de glicerol, 0,5 mL de PBS e 5,0 mg de p-fenilendiamina) foram colocados na lâmina e cobertos com uma lamínula, são contados 200 espermatozoides no microscópio de epifluorescência (Carl Zeiss; Alemanha, 1000X) de forma, e em campos, aleatórios, com um filtro de emissão LP de 515 nm e BP de 450-490 nm filtro de excitação, onde as células que apresentam fluorescência estão com o acrossoma íntegro e as que não apresentam estão com o acrossoma reagido (Figura 3).

Figura 3 – Avaliação da integridade acrossomal de espermatozoides ovinos refrigerados em meio TRIS-gema com adição ou não de Tanino.

Figure 3 – Assessment of the acrosomal integrity of sheep spermatozoa refrigerated in TRIS-yolk medium with or without the addition of Tannin.



Todos os dados foram checados para normalidade e transformados quando necessário. Para todas as análises estatísticas, foi utilizado análise de variância (ANOVA) seguida do teste Tukey entre os momentos e grupos avaliados. As diferenças consideradas significativas foram quando $p < 0.05$. O trabalho foi aprovado pelo **Comitê de Ética em Utilização Animal (CEUA) da UNIBRA** sob o número **001/2023**.

3. Resultados e Discussão

Foram realizadas quatro repetições de coleta/resfriamento e análise do sêmen ovino. A adição de 100 mg/mL de Tanino ao diluidor a base de Tris-gema causou mudanças no aspecto do meio, como pode ser observado na Figura 4, além da mudança na cor também foi detectado a presença de partículas quando observado em microscopia de luz (400X) dificultando a avaliação neste grupo. As médias da motilidade espermática do sêmen ovino refrigerado em meio TRIS-gema adicionado ou não de Tanino estão apresentados no Gráfico 1.

Neste estudo, todas as avaliações dos parâmetros de motilidade espermática e do status do acrossomo foram realizadas de forma subjetiva. Tais procedimentos ainda são amplamente utilizados na prática laboratorial pela praticidade, baixo custo e repetitividade, se executado por operador experiente e treinado, facilitando assim a comparação de resultados com outros trabalhos^{15, 14 16, 17}.

Na variação entre os momentos avaliados os grupos T2 e T3 apresentaram motilidade significativamente menor após 72 de resfriamento ($p < 0,5$), comparado aos grupos Controle e T1 que houve diminuição estatística já nas 48h após a criopreservação. Indicando que a adição de Tanino nas concentrações de 1 ou 10 mg/mL pode ajudar na criopreservação de sêmen ovino refrigerado por até 48 horas sem que ocorra a diminuição da motilidade.

Entre os grupos avaliados, às 48h após resfriamento, foi observado a motilidade significativamente maior no grupo T2 quando comparada ao grupo Controle ($p < 0,5$), nos outros momentos analisados não houve diferenças entre os grupos avaliados. Sarlós et al.¹⁸, trabalhando com sêmen de carneiros refrigerado, adicionado de antioxidantes, observou um prolongamento da motilidade e integridade das membranas

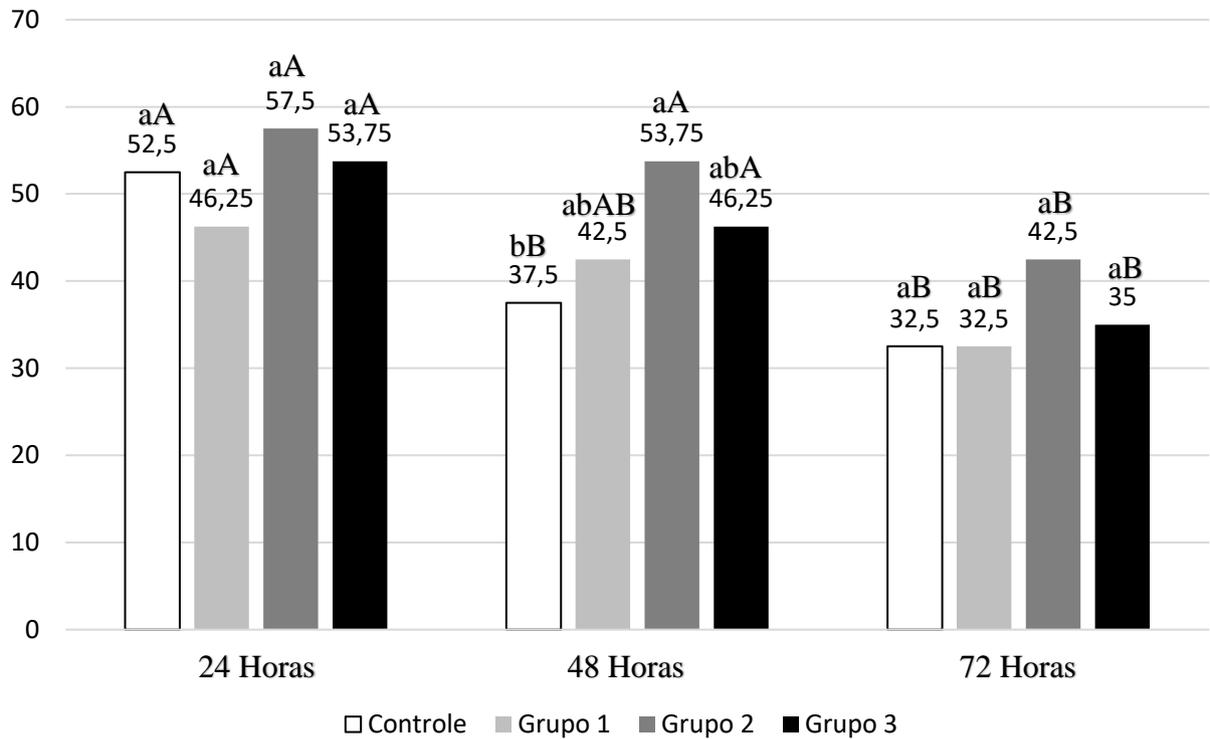
espermáticas.

Figura 4 – Alteração da coloração do grupo T1 a esquerda e grupo controle a direita.
 Figure 4 – Change in color in the T1 group on the left and control group on the right.



Gráfico 1 - Média da motilidade espermática (%) de sêmen ovino refrigerado em diluidor Tris-gema com ou sem adição de tanino em diferentes concentrações.

Graph 1 - Average sperm motility (%) of sheep semen refrigerated in Tris-yolk extender with or without the addition of tannin in different concentrations



Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os grupos, letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa entre os momentos avaliados ($p > 0,5$).

A motilidade espermática é de extrema importância nos processos de fertilização, pois esta é capaz de

favorecer o percurso do sêmen ao longo do aparelho reprodutor da fêmea, sendo assim possível adentrar aos oócitos¹⁹. Portanto, sabe-se que, para que haja a fecundação deste oócito, os espermatozoides devem possuir membranas íntegras e desta forma, segundo Soares e Guerra²⁰, seja estimado como potencialmente fértil. Tais fatores influenciam diretamente em bons resultados na inseminação artificial.

Luz et al.²¹, em trabalho a campo com ovinos, observaram que os índices de gestação obtidos estão relacionados com a motilidade espermática pós-descongelamento. Os autores ressaltaram que, após a descongelamento, o índice de motilidade espermática deve ser superior a 40% visando obter taxa de gestação superior a 50%, enquanto motilidade espermática inferior a 40% reduz para 15% o percentual de fêmeas ovinas gestantes. Comparado ao nosso trabalho, podemos destacar que o sêmen refrigerado com a adição de Tanino pode melhorar os índices reprodutivos nos rebanhos ovinos mesmo após 72 horas após a coleta.

Em ovinos, quando os espermatozoides são resfriados até próximo do ponto de congelamento, a motilidade e a atividade metabólica são irreversivelmente deprimidas e as membranas do acrossomo e plasmática são rompidas^{22, 23, 24}. Os fosfolipídios presentes na gema de ovo, quando os diluentes são a base deste composto, como utilizado em nosso estudo, protegem a membrana espermática restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico, causado pela mudança de temperatura durante o resfriamento do sêmen^{25, 23}.

A integridade acrossomal foi expresso em tabela (Tabela 1), não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos e o tempo de refrigeração.

Tabela 1 – Percentuais de integridade de acrossoma de espermatozoides ovino refrigerados com diferentes concentrações de Tanino ao diluidor Tris-gema em diferentes momentos.

Table 1 – Percentages of acrosome integrity of sheep spermatozoa refrigerated with different concentrations of Tannin to the Tris-yolk extender at different times.

	Grupo Controle	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
24 horas	87,5 %	97 %	97,5 %	93 %
48 horas	97 %	98 %	98,5 %	98 %
72 horas	97,5 %	92,5 %	98 %	95,5 %

Embora não tenha sido observado uma manutenção significativa da integridade acrossomal dos espermatozoides ovinos refrigerados por até 72 horas com a adição de diferentes concentrações de Tanino ao diluidor Tris-gema, os resultados do grupo Controle demonstram a eficácia do diluidor na refrigeração de sêmen para esta espécie.

O elevado percentual de espermatozoides com acrossoma íntegro foi constatado nas associações das diferentes concentrações de Tanino, devido ao efeito estimulatório, que atuam em diferentes partes da célula contra o dano oxidativo, além de elevar a atividade das enzimas que participam na defesa antioxidante. Dessa forma, o uso de antioxidantes, como o Tanino, potencializa de forma eficiente a conservação das características acrossomais após o processo de refrigeração.

4. Conclusão

A adição de 10 mg/ml de Tanino ao diluidor Tris-gema para refrigeração de sêmen ovino, preserva a motilidade espermática elevada até 48 horas após a criopreservação, e mantém o sêmen viável por até 72 horas refrigerado. Mostrando a eficácia do uso do Tanino como agente antioxidante para criopreservação de

sêmen ovino, melhorando a difusão de material genético superior desta espécie.

5. Agradecimentos

Nossos mais sinceros agradecimentos ao Laboratório de Biotécnicas Aplicadas à Reprodução da Universidade Federal Rural de Pernambuco (LBR – UFRPE) e ao prof. André Mariano Batista por todo o suporte prestado durante a execução deste experimento.

6. Referências

- ¹ SIMPLÍCIO, A. A. et. al. A caprino-ovino cultura de corte como alternativa para a geração de emprego e renda. Sobral: Embrapa Caprinos. 44 p. 2003.
- ² MAPA. Caprinos e Ovinos. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/animal/especies/caprinos-e-ovinos>>. Acesso em 25 de outubro de 2011.
- ³ O'HARA, L. et. al. Effect of storage duration, storage temperature, and diluents on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, v. 73. p. 541-549. 2010.
- ⁴ SILVA JÚNIOR, R.A. Avaliando os efeitos das proteínas anticongelantes na viabilidade de embriões bovinos produzidos in vitro vitrificados. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2022.
- ⁵ LEBOEUF, B.; RESTALL, B.; SALAMON, S. Production and storage of goat semen for artificial insemination. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.113-141, 2000.
- ⁶ SANTOS, A. D. F. et. al. Uso de testes complementares para avaliação do congelamento do sêmen de bodes submetidos ao manejo de fotoperíodo artificial. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v. 35. n.5. p. 1934-1942. 2006.
- ⁷ CHATTERJEE, S.; GAGNON, C. Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing. *Molecular Reproduction and Development*. v. 59. p. 451-458. 2001.
- ⁸ ORTEGA, A. M. et. al. Peroxidación lipídica y antioxidantes en la preservación de semen: una revisión. *Interciencia*, v.28, p.699-704, 2003.
- ⁹ SILVA, E.C.B. Efeito da adição de diferentes crioprotetores e antioxidantes na criopreservação de sêmen de ovinos da raça Santa Inês. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2010.
- ¹⁰ KACZMAREK, B. Tannic Acid with Antiviral and Antibacterial Activity as A Promising Component of Biomaterials—A Minireview. *Materials* 13, 3224, 2020.
- ¹¹ SALLAM, S.M.; et al. Involvement of Quebracho tannins in diet alters productive and reproductive efficiency of postpartum buffalo cows. *Anim. Nutr.* 5, 80–86, 2018.
- ¹² COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104p.

- ¹³ ARAÚJO SILVA, R. A. J.; BATISTA, A. M.; ARRUDA, L. C. P.; SOUZA, H. M.; NERY, I. H. A. V.; GOMES, W. A. SOARES, P. C.; SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Concentration of soybean lecithin affects short-term storage success of goat semen related with seminal plasma removal. *Animal Reproduction*, v. 16, n. 4, p. 895-901, 2019.
- ¹⁴ OKANO, D. S. et al. In vitro evaluation of cryopreserved bovine sperm and its relation to field fertility in fixed-time artificial insemination. *Reproduction in Domestic Animals, Germany*, v. 54, p. 604-612, 2019.
- ¹⁵ ILJENKAITE, A. et al. The effect of royal jelly on boar sperm viability and motility during liquid storage for 96 hours. Lithuanian University of Health Sciences, Veterinary Academy, Kaunas, Lithuania. *Acta Veterinaria Brno, Czechia*, v. 89, p. 47-53, 2020.
- ¹⁶ CRESPILO, A. M. et al. Sperm fertility and viability following 48 h of refrigeration: Evaluation of different extenders for the preservation of bull semen in liquid state. *Animal Reproduction Science, Netherlands*, v. 146, p. 126-133, 2014.
- ¹⁷ KULAKSIZ, R. et al. The effect of different extenders on the motility and morphology of ram sperm frozen or stored at 4°C. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, Turkey*, v. 36, p. 177-182, 2012.
- ¹⁸ SÁRLOS, P. et al. Comparative evaluation of the effect of antioxidants in the conservation of ram semen. *Acta Vet Hung.* v. 50, p. 235-245. 2002.
- ¹⁹ KUMAR, S. Cellular damages during cryopreservation and assessment of in vitro fertilizing capacity of spermatozoa. *Indian Veterinary Medicine Journal*, v.24, p.1-6, 2000.
- ²⁰ SOARES, A.T.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. *Tecnol. Cienc. Agrop.*, v.3, p.53-63, 2009.
- ²¹ LUZ, S.L.N.; NEVES, J.P.; GONÇALVES, P.B.D. Parâmetros utilizados na avaliação do semen congelado ovino para inseminação laparoscópica. *Braz J Vet Res Anim Sci*, v.37, p.141-145, 2000.
- ²² BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.F.; CORMIER, N. Sperm cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J Androl*, v.21, p.1-7, 2000.
- ²³ PURDY, P. H. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research, Netherlands*, v. 63, p. 215-225, 2006.
- ²⁴ WHITE, I. G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reproduction, Fertility and Development, Australia*, v. 5, p. 639-658, 1993.
- ²⁵ HAMMERSTEDT R. H. et al. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of Andrology, United States*, v. 11 p. 73–88, 1990.

