

Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c¹

Antonio C. Mota Filho^{2*}, Herlon V.R. Silva², Luana A. Freitas², Thalles G.P. Nunes², Airton A. Araújo³ e Lúcia D.M. Silva²

ABSTRACT- Mota Filho A.C., Silva H.V.R., Freitas L.A., Nunes T.G.P., Araújo A.A. & Silva L.D.M. 2013. [Cooling of the canine epididymis at 4°C and recovery of epididymal sperm using ACP-106c.] Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 33(9):1155-1160. Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Universidade Estadual do Ceará, Campus do Itaperi, Avenida Paranjana 1700, Fortaleza, CE 60740-903, Brazil. E-mail: acmfmedvet@hotmail.com

The study aimed to assess the quality of sperm recovered from the epididymal cauda after cooling the complex testis-epididymis (CTE) of dogs using ACP-106c extender. Sixty adult male dogs, weighing 10-20 kg were used. After euthanasia, CTE was removed and it was immersed in 0.9% saline and transported to the laboratory in cooler at 30°C. For cooling and recovery of epididymal spermatozoa, the 60 pairs of CTE were divided into four groups, according to the refrigeration time of the CTE and subsequent sperm recovery: G0h, G6h, G12h and G18h, wherein each pair of CTE remained zero, six, 12 or 18 hours at 4°C respectively. The recovery of sperm epididymal tail was conducted by flotation technique using ACP-106c or Tris extender. For each epididymis, it was added 1.0 mL of either extenders, preheated to 37°C for 5 minutes. They were then centrifuged at 800g/5 minutes to remove the cell debris. Morphology, functionality and total and progressive motility, and parameters obtained by CASA were evaluated. Data were analyzed by ANOVA followed by Turkey test (P <0.05). In all parameters assessed, there was no difference between the extenders used (P>0.05). The values of total motility groups G0h, G6H, G12H, and G18h for ACP-106c were 84.4±7.7, 81.6±11.6, 88.3±6.5 and 69.5±16.9 respectively, and for Tris 85.2±8.7, 77.4±14.3, 79.0±17.8 and 65.4±17.9 respectively. A decrease in sperm quality was observed after 18 hours of cooling in both extenders. Thus it can be concluded that the ACP-106c may be used to recover the epididymal spermatozoa chilled and may be viable for up to 12h cooling.

INDEX TERMS: Refrigeration, epididymis, dogs.

RESUMO.- Mota Filho A.C., Silva H.V.R., Freitas L.A., Nunes T.G.P., Araújo A.A. & Silva L.D.M. 2013. Objetivou-se avaliar a qualidade dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo após a refrigeração do complexo testículo-epidídimo (CTE) de cães usando o diluidor ACP-106c. Foram utilizados 60 cães machos adultos, com peso de 10-20 kg.

Após a eutanásia, removeu-se o CTE que foi imerso em solução fisiológica 0,9% e transportado em caixa térmica ao laboratório a 30°C. Para a refrigeração e recuperação dos espermatozoides epididimários, os 60 pares do CTE foram divididos em 4 grupos, de acordo com o tempo de refrigeração do CTE e posterior recuperação espermática: G0h, G6h, G12h e G18h, em que cada par do CTE permaneceu por zero, seis, doze ou dezoito horas a 4°C, respectivamente. A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de flutuação utilizando-se o diluidor ACP-106c ou Tris. Para cada epidídimo foi adicionado 1,0 mL de um dos dois diluidores, pré-aquecidos a 37°C por 5 minutos. Em seguida foram centrifugados a 800g/5 minutos para remoção dos resíduos celulares. Avaliou-se

¹ Recebido em 23 de fevereiro de 2013.

Aceito para publicação em 21 de agosto de 2013.

² Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Campus do Itaperi, Avenida Paranjana 1700, Itaperi, Fortaleza, CE 60740-903, Brasil. *Autor para correspondência: acmfmedvet@hotmail.com

³ Faculdade de Zootecnia, UECE, Campus do Pici, Av. Mister Hull 2977, Fortaleza, CE 60021-970.

a morfologia, funcionalidade e motilidade espermática total e progressiva, além de parâmetros obtidos pelo CASA. Os dados foram submetidos à ANOVA seguido do teste de Turkey ($P < 0,05$). Em todos os parâmetros avaliados, não houve diferença entre os diluidores testados ($P > 0,05$). Os valores de motilidade total nos grupos G0h, G6h, G12h, e G18h para o ACP-106c foram $84,4 \pm 7,7$; $81,6 \pm 11,6$; $88,3 \pm 6,5$ e $69,5 \pm 16,9$, respectivamente, e para o Tris $85,2 \pm 8,7$; $77,4 \pm 14,3$; $79,0 \pm 17,8$ e $65,4 \pm 17,9$, respectivamente. Um decréscimo na qualidade espermática foi observado após 18 horas de refrigeração em ambos os diluidores. Dessa forma pode-se concluir que o ACP-106c pode ser utilizado para recuperar os espermatozoides epididimários refrigerados e podem ser viáveis por até 12h de refrigeração.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Refrigeração, epidídimo, caninos.

INTRODUÇÃO

A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo pode ser uma alternativa importante na reprodução canina (Hewitt et al. 2001). É uma biotécnica reprodutiva valiosa em casos de animais de companhia que possuem um valor comercial, zootécnico e afetivo elevado, que por algum motivo necessitem ser esterilizados, sacrificados ou que morram inesperadamente, já que os espermatozoides obtidos por esta técnica são morfologicamente viáveis e retêm a capacidade de sofrer capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fertilizar o oócito (Goodrowe & Hay 1993, Luvoni et al. 2003, Tsutsui et al. 2003).

Estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de armazenar os testículos e os epidídimos de garanhões (Bruemmer et al. 2002, James et al. 2002, Heise et al. 2010), cães (Yu & Leibo 2002), touros (Martins et al. 2009), burros (Contri et al. 2011) e carneiros (Lone et al. 2011, Tamayo-Canul et al. 2011). Tais estudos preconizam adequar um protocolo que possibilite a retirada do complexo testículo-epidídimo (CTE) e seu posterior acondicionamento em sistemas de transporte para seu envio a laboratórios especializados para processamento, refrigeração e criopreservação dos espermatozoides.

Pesquisas conduzidas com CTE que foram mantidos em temperatura ambiente por até 5 horas não detectaram grandes alterações na motilidade espermática em gatos (Schäfer & Holzmann, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos mantendo CTE de gatos sob refrigeração a 5°C *overnight* (Goodrowe & Hay, 1993). No entanto, há poucas informações acerca da recuperação de espermatozoides epididimários caninos mantidos sob refrigeração. Não há ainda trabalhos sobre a refrigeração de epidídimos de cães e posterior recuperação dos espermatozoides para avaliação *in vitro* da viabilidade espermática, visando à inseminação artificial.

Para recuperação e conservação da célula espermática faz-se necessário o emprego de um meio diluidor. O Tris é um diluidor que já se mostrou eficiente para conservação de espermatozoide epididimário canino (Hewitt et al. 2001, Ponglowhapan et al. 2006). Por outro lado, o diluidor ACP-106c já demonstrou ser igualmente eficaz na conservação de sêmen canino refrigerado (Uchoa et al. 2012) sendo

também utilizado para a conservação de espermatozoides do epidídimo de cutias (Silva et al. 2011). No entanto, esse diluidor à base de água de coco em pó ainda não foi testado para recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de cão, podendo ser um diluidor alternativo e interessante para conservação de espermatozoides epididimários nessa espécie, como o foi para cutias.

Não há nenhum trabalho disponível com relação à refrigeração e recuperação espermática do CTE de cães utilizando diluidores à base de água de coco. Dependendo da forma como é conservado, podem ocorrer mudanças importantes na qualidade dos espermatozoides. Isto pode ser um entrave para a recuperação do material genético de animais que morreram inesperadamente e estão distantes do laboratório (Kabbi et al. 2003).

Assim, o estudo sobre a conservação do epidídimo canino sob refrigeração e posterior recuperação dos espermatozoides e diluição em ACP-106 é de grande importância, uma vez que abre a perspectiva de alternativas para a conservação do sêmen de reprodutores valiosos. Além do mais, o estudo de biotecnologias de sêmen canino serve como modelo a ser posteriormente testados para o sêmen de canídeos selvagens, tais como o lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro vinagre (*Speotot venaticus*) de ocorrência no Brasil e ameaçados de extinção (Silva et al., 2001).

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a qualidade dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo e armazenados após a refrigeração usando o diluidor ACP-106c, pois acredita-se que o referido diluidor seja eficiente na recuperação dos espermatozoides epididimários após o CTE ter sido mantido refrigerado a 4°C .

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais. O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (protocolo no. 11221529-7/39). Foram utilizados 60 cães machos sexualmente maduros, sem raça definida, com peso de 10-20 kg, oriundos do Centro de Controle de Zoonoses de Fortaleza, Ceará.

Eutanásia e orquiectomia bilateral. Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas antecedendo a eutanásia. Para o procedimento de eutanásia, foi administrado 0,5 mg/Kg/IV de cloridrato de xilazina 10%, associado a 50mg/kg/IV de cloridrato de quetamina. Após 15 minutos da administração da anestesia, foi administrado cloreto de potássio 19,1% para indução de parada cardíaca na dose de 1mL/kg ou 2,56mEq/kg. Em seguida, procedeu-se a remoção do CTE e o par contendo o CTE foi imerso em solução fisiológica 0,9% a 30°C e transportado em caixa térmica até o laboratório nessa mesma temperatura em um tempo médio de 20 minutos.

Refrigeração do complexo testículo-epidídimo. Após serem transportados os pares contendo o CTE foram colocados em refrigerador a 4°C , divididos em grupos, sendo 15 pares destinados para cada grupo: (G0h) não foi refrigerado, sendo os demais refrigerados a 4°C por seis (G6h), doze (G12h) ou dezoito horas (G18h).

Recuperação dos espermatozoides do epidídimo. A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de flutuação relatada por Yu & Leibo (2002). O tecido conjuntivo que recobre o epidídimo foi removido e os contornos do ducto epididimário da cauda do epidídimo desfeitos. Cada ducto epididimário foi colocado em placa de petri individual pre-

viamente aquecida a 37°C. Em seguida, foram realizados cortes na região do ducto deferente e cauda epididimária, logo após foi adicionado 1,0 mL de diluente ACP-106c (ACP Biotecnologia®) ou 1,0mL de diluente Tris (Sigma®), ambos diluentes pré-aquecidos a 37°C, deixando em repouso por 5 minutos para que os espermatozoides entrassem em contato com o diluente, em seguida foram centrifugados a 800g por 5 minutos para remoção dos resíduos celulares.

Avaliação dos espermatozoides epididimários. Os espermatozoides colhidos foram avaliados quanto à morfologia espermática, funcionalidade de membrana, motilidade total e progressiva, além da velocidade média na trajetória (VAP), velocidade curvilínea (VCL), velocidade linear (VSL), índice de progressão (STR) e de linearidade (LIN).

A morfologia espermática foi realizada utilizando 10µL da amostra em 150µL do corante Rosa de Bengala, sendo realizado esfregão úmido e avaliado através de microscopia óptica no aumento de 1000x, contando-se 200 células que foram classificadas como normal ou anormal (Mota Filho et al. 2011).

A funcionalidade da membrana espermática foi avaliada por meio do teste hiposmótico (HOST) realizado imediatamente após a recuperação espermática, usando-se água destilada como solução hiposmótica. Uma alíquota da amostra foi diluída na proporção de 10µL da amostra para 90 µL de água destilada uma alíquota espermática foi colocada em uma lâmina de vidro, coberta com lamínula, sendo contadas 200 células com auxílio de microscópio óptico com aumento de 400x. Após este período, a membrana espermática foi considerada funcional quando os espermatozoides apresentavam sua cauda enrolada (Quintela et al. 2010).

Para a análise computadorizada utilizou-se um microscópio de contraste de fases acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema *Sperm Class Analyser*® (SCA, Microptic S.L., versão 5.2.0). Os parâmetros mensurados na avaliação computadorizada das amostras foram: motilidade total, motilidade progressiva, VAP, VCL, VSL, STR e LIN (Mota Filho et al. 2011, Uchoa et al. 2012).

Análise estatística. Análises estatísticas dos dados referentes a parâmetros motilidade espermática (motilidade total, motilidade progressiva, VCL, VAP, LIN, STR, morfologia, e HOST) foram realizadas por ANOVA utilizando o procedimento GLM (General Linear Model) do programa SYSTAT versão 7.0, USA.

As comparações entre os diluidores e horas de conservação foram realizadas pelo teste de Turkey (teste de comparação aos pares). Antes de analisar os dados foram expressos em porcentagem (motilidade, motilidade progressiva, morfologia e HOST) foi realizada uma transformação angular de porcentagens. Esta transformação permitiu em vez de utilizar a proporção encontrada, empregar o valor de ACS (SQR (MOTILIDADE/100)), ACS (SQR (MOTPROG/100)), ACS (SQR (MORFO/100)) e ACS (SQR (HOST/100)) expresso em graus, para expressão da distribuição normal dos dados.

RESULTADOS

Os diluidores ACP106c e Tris foram similares na conservação da morfologia espermática no decorrer de todo o experimento ($P>0,05$). No entanto, verificou-se que com 18 horas ocorreu um decréscimo significativo da morfologia espermática ($P<0,05$; Fig.1).

Não foram evidenciadas diferenças entre os diluidores com relação à resposta osmótica das células espermáticas ($P>0,05$), existindo, no entanto, um declínio significativo da função de membrana das células com 18 h ($P<0,05$; Fig.2).

A motilidade total manteve-se inalterada até 12 horas

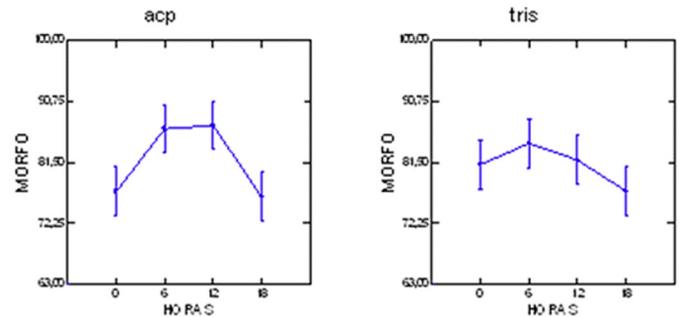


Fig.1. Morfologia espermática (média \pm DP) em relação aos períodos de avaliação utilizando (A) o diluidor ACP-106c e (B) Tris ($P>0,05$).

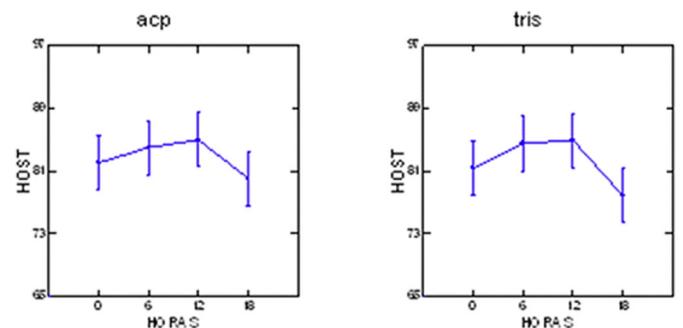


Fig.2. Percentual (média \pm DP) de espermatozoides com cauda enrolada (funcionalidade espermática) em relação aos períodos de avaliação utilizando o diluidor ACP-106c e Tris ($P>0,05$).

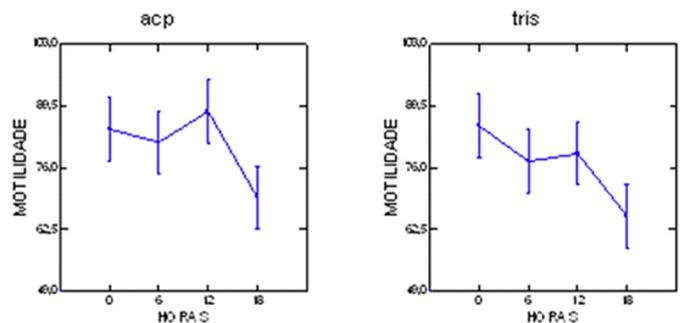


Fig.3. Motilidade total (média \pm DP) em relação aos períodos de avaliação utilizando o diluidor ACP-106c e Tris ($P>0,05$).

de refrigeração e declinou significativamente após 18 horas ($P<0,05$; Fig.3).

Os dados referentes à avaliação da motilidade progres-

Quadro 1. Percentual (média \pm DP) de motilidade progressiva por meio da análise computadorizada, utilizando os diluidores ACP-106c e Tris para a recuperação de espermatozoides epididimários após serem mantidos refrigerados por 0, 6, 12 ou 18h

Motilidade progressiva (%)	ACP-106c	Tris
0h	34,5 \pm 12,0 ^{aA}	28,0 \pm 9,4 ^{aA}
6h	45,0 \pm 30,3 ^{aA}	40,4 \pm 16,2 ^{aA}
12h	39,1 \pm 18,8 ^{aA}	32,1 \pm 13,9 ^{aA}
18h	25,6 \pm 13,9 ^{bA}	23,5 \pm 8,5 ^{bA}

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que houve diferença estatística entre as horas ($P<0,05$).

Letras maiúsculas iguais na mesma linha indicam que não houve diferença estatística entre os diluidores ($P>0,05$).

Quadro 2. VAP, VCL, VSL, LIN E STR (média ± desvio padrão), utilizando os diluidores ACP-106c e Tris para a recuperação de espermatozoides epididimários após serem mantidos refrigerados por 0, 6, 12 ou 18h

Hora	Diluidor	Parâmetros				
		VAP	VCL	VSL	LIN	STR
0h	ACP-106c	79,9±7,1 ^a	95,4±16,1 ^a	73,6±9,2 ^a	57,0±12,3 ^a	71,1±10,8 ^a
	Tris	77,4±8,3 ^a	84,1±12,9 ^a	66,5±11,2 ^a	53,9±13,3 ^a	63,5±13,4 ^a
6h	ACP-106c	64,8±21,2 ^b	93,5±21,7 ^a	57,4±29,3 ^a	60,9±15,3 ^a	86,9±9,5 ^a
	Tris	60,8±18,6 ^b	88,6±31,6 ^a	55,0±20,7 ^a	54,4±12,3 ^a	83,3±9,4 ^a
12h	ACP-106c	72,2±12,6 ^{ab}	100,8±14,5 ^a	61,3±18,4 ^a	58,1±12,7 ^a	81,2±11,6 ^a
	Tris	68,4±15,0 ^{ab}	98,3±19,3 ^a	57,3±18,8 ^a	55,8±12,5 ^a	80,1±11,2 ^a
18h	ACP-106c	66,0±20,6 ^b	88,1±22,1 ^a	59,8±22,5 ^a	65,0±12,5 ^a	88,6±6,9 ^a
	Tris	66,1±22,4 ^b	89,4±20,9 ^a	58,2±22,8 ^a	62,2±11,2 ^a	88,7±6,3 ^a

Letras minúsculas diferentes na mesma coluna (comparação entre as horas dentro de um mesmo diluidor) indicam que houve diferença estatística ($P < 0,05$).

siva estão expressos no Quadro 1. Não foram evidenciadas diferenças entre os dois diluidores no que se refere à conservação da motilidade espermática em nenhum dos momentos de avaliação ($P > 0,05$). Porém foi observado um declínio deste parâmetro em ambos os grupos após 18 horas de refrigeração ($P < 0,05$).

Os parâmetros da análise computadorizada, mais uma vez não diferiram entre os diluidores testados ($P > 0,05$). Com relação aos tempos de refrigeração, também não foram observadas diferenças nas VCL, VSL, LIN e STR ($P > 0,05$). No entanto, a VAP reduziu após 6 horas de refrigeração.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, ambos os diluidores (ACP-106c ou Tris) foram eficientes para a recuperação de espermatozoides epididimário em cães segundo a técnica de Yu & Leibo (2002). O Tris já havia sido testado em cães para recuperação de espermatozoides epididimários com sucesso (Hori et al. 2005, Ponglowhapan et al. 2006, Martins et al. 2009). Porém o diluidor à base de água de coco nunca havia sido utilizado para esse fim em cães, apenas em cutias (Silva et al. 2011), e esses autores obtiveram melhores resultados com o ACP-109c quando comparado com o Tris.

Com base nos resultados do presente trabalho, observou-se que os diluidores ACP-106c e Tris tiveram melhores resultados quando comparados aos relatados por Ponglowhapan et al. (2006) e Melo et al. (2010) que utilizaram Tris e obtiveram 68% e 45% motilidade total, respectivamente. Já Yu & Leibo (2002) que utilizaram solução salina obtiveram 65% de motilidade total. Dessa maneira, o ACP-106c pode ser um diluidor alternativo passível de substituir o Tris.

Os resultados de morfologia espermática obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos descritos por Yu & Leibo (2002) em torno de 80% de células normais. A porcentagem de alterações observadas com o ACP e Tris foram praticamente iguais, sendo observado uma redução com o decorrer do tempo. Apesar de às 18h ter apresentado o menor percentual de células normais, esses resultados encontram-se de acordo com a faixa normal descrita no manual do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (1998).

Os valores encontrados no teste hiposmótico foram se-

melhantes à motilidade total o que corrobora com os relatos de Rota et al. (2005) e Silva et al. (2006). A avaliação da integridade de membrana através do teste hiposmótico é simples, sendo considerado como um indicativo da fertilidade em algumas espécies como bovinos (Revell & Mrode 1994), javali (Perez-Llano et al. 2001). Nos cães, a correlação da resposta osmótica com a fertilidade *in vivo* ou *in vitro* ainda não foi estabelecida (Peña-Martinez. 2004).

O teste hiposmótico utilizando a água destilada (Quintela et al. 2010) é um método eficiente para analisar a integridade funcional da membrana do espermatozoide epididimário fresco (Hishinuma & Sekine 2003).

Os epidídimos podem ser transportados refrigerados para os centros especializados em recuperação, refrigeração e congelamento de amostras do epidídimo ou ainda processado no próprio local por um técnico especializado (Bruemmer et al. 2002). Amostras oriundas de epidídimos refrigerados a 5°C durante 24 h podem ser aproveitadas para uma posterior congelamento em diferentes espécies (Marks et al. 1994, Blash et al. 2002, Soler et al. 2003).

Após a morte do ganhão, os espermatozoides permanecem viáveis no epidídimo até que a decomposição tecidual afete sua viabilidade (Bruemmer et al. 2002, Muradás et al. 2006). Se os epidídimos forem armazenados a 5°C por 24, 48 72 e 96 horas, a viabilidade espermática pode ser mantida por mais tempo (Bruemmer et al. 2002, James et al. 2002).

Com relação à motilidade espermática total e progressiva, os resultados deste estudo mostram que nos cães pode ocorrer uma redução desse parâmetro a baixas temperaturas, mesmo os espermatozoides estando em um ambiente protegido, dentro do epidídimo, até a sua posterior recuperação (Yu & Leibo 2002). O espermatozoide do ganhão (Amann et al. 1999), gato (Parks 1997) e cão (Province et al. 1984, Watson 1995) é pouco sensível ao choque térmico.

Acredita-se então que a redução da motilidade total e progressiva com 18 horas seja em decorrência do tempo de refrigeração do CTE. Os dados referentes à análise computadorizada apresentaram valores semelhantes aos descritos por (Martins et al. 2009), exceto a motilidade total que foi de 44%. No entanto, esses valores encontram-se

dentro de uma faixa aceitável para posterior inseminação artificial em cadelas. Outro parâmetro que vale destacar é a VAP, pois mesmo apresentando diferenças entre as horas, ainda apresentou valores em torno de 70%. A VAP é conhecida como um parâmetro significativa da fertilidade *in vitro* (Silva et al. 2006, Versteegen et al. 2002).

CONCLUSÕES

O CTE canino pode ser conservado até 18 horas sob refrigeração a 4°C, preservando a qualidade espermática pós coleta e diluição. Contudo, visando utilização em inseminação artificial, a conservação até 12 horas apresenta qualidade seminal aceitável.

O diluidor ACP-106c foi eficiente para preservação *in vitro* dos espermatozoides canino pós-recuperação a 37°C, permitindo uma boa avaliação dos parâmetros de motilidade espermática.

Contudo, testes *in vivo*, via inseminação são necessários para confirmação dos resultados obtidos *in vitro*, verificando-se a preservação do poder fecundante dos espermatozoides epididimários.

Agradecimentos.- Ao Centro de Controle de Zoonoses por termos permitido utilizar os animais de seu canil. Esse trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Funcap) por meio da concessão de bolsas a ACMF e LDMS. As agências financiadoras não tiveram participação na elaboração do desenho experimental, coleta de dados e análises, decisão de publicar ou preparação do manuscrito.

Declaração de Conflito de Interesses.- Os autores declaram nenhum conflito de interesse no que diz respeito à pesquisa, autoria, e/ou publicação desse artigo.

REFERÊNCIAS

- Amann R.P., Shabanowitz R.B., Huszar G. & Broder S.J. 1999. In vitro sperm-binding assay to distinguish differences in populations of human sperm or damage to sperm resulting from cryopreservation. *J. Androl.* 20:648-654.
- Blash S., Melican D. & Gavin W. 2002. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology* 54:899-905.
- Bruemmer J.E., Reger H., Zibinski G. & Squires E.L. 2002. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 58:405-407.
- CBRA 1998. Manual para Exame Andrológico e Avaliação de Sêmen Animal. 2ª ed. CBRA, Belo Horizonte. 49p.
- Contri A., Gloria A., Robbe D., Amicis I.D. & Carluccio A. 2011. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology* 77:166-173.
- Goodrowe K.L. & Hay M. 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 40:967-975.
- Heise A., Kähn W., Volkman D.H., Thompson P.N. & Gerber D. 2010. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 118:48-53.
- Hewitt D.A., Leahy R., Sheldon I.M. & England G.C. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 67:101-111.
- Hishinuma M. & Sekine J. 2003. Evaluation of membrane integrity of canine epididymal spermatozoa by short hypoosmotic swelling test with ultrapure water. *J. Vet. Med. Sci.* 65:817-820.
- Hori T., Hagiuda K., Kawakami E. & Tsutsui T. 2005. Unilateral intrauterine insemination with prostatic fluid-sensitized frozen caudal epididymal sperm in beagle dogs. *Theriogenology* 63:1573-1583.
- James A.N., Green H., Hoffman S., Landry A.M., Paccamonti D. & Godke R.A. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4°C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology* 58:401-404.
- Kaabi M., Paz P., Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., Rouissi H., Herraes P. & Anel L. 2003. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology* 60:1249-1259.
- Lone F.A., Islam R., Khan M.Z. & Sofi K.A. 2011. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. *Anim. Reprod. Sci.* 123:54-59.
- Luvoni G.C., Ruggiero C., Marinoni G. & Kalchschmidt E. 2003. Effect of taurine containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal sperm. *Theriogenology* 57:466.
- Marks S.L., Dupuis J., Mickelson W.D., Memon M.A. & Platz C.C.J.R. 1994. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204:1639-1640.
- Martins C.F., Driessen K., Melo Costa P., Carvalho-Neto J.O., Sousa R.V., Rumpf R. & Dode M.N. 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. *Anim. Reprod. Sci.* 116:50-57.
- Melo J.V.S., Oliveira G.R., Valle M.A., Rachid F.C.G., Soares J.J.R.T. & Matos M.I.V. 2010. Efeito da centrifugação e do líquido prostático homólogo na criopreservação de espermatozoides epididimários caninos. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62:603-608.
- Mota Filho A.C., Teles C.H.A., Jucá R.P., Cardoso J.F.S., Uchoa D.C., Campello C.C., Silva A.R. & Silva L.D.M. 2011. Dimethylformamide as a cryoprotectant for canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology* 76:1367-1372.
- Muradás P.R., Weiss R.R., Kozicki L.E., Granemann L.C., Santos I.W. & Pimpão C.T. 2006. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Archs Vet. Sci.* 11:69-74.
- Parks J.E. 1997. Hypothermia and mammalian gametes, p.229-261. In: Karow A.M. & Critser J.K., (Eds), Reproductive tissue banking. Academic Press, San Diego.
- Peña-Martinez I. 2004. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. *Anim. Reprod. Sci.* 82/83:209-224.
- Perez-Llano B., Lorenzo J.L., Yenes P., Trejo A. & Garcia-Casado P. 2001. A short hyposmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. *Theriogenology* 56:387-398.
- Ponglowhapan S. & Chatdarong K. 2006. Effects of Equex STM Paste/Von the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology* 69:66-72.
- Province C.A., Amann R.P., Pickett B.W. & Squires E.L. 1984. Extenders for preservation of canine and equine spermatozoa at 5°C. *Theriogenology* 22:409-15.
- Quintela A.T., Oliveira I.R.S., Souza A.O., Gusmão A.L. & Silva A.R. 2010. Water-induced hypo-osmotic test for the evaluation of canine sperm membrane integrity. *Anim. Reprod.* 7:70-74.
- Revel S.G. & Mrode R.A. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim. Reprod. Sci.* 36:77-86.
- Rota A., Martine M., Milani C. & Romagnoli S. 2005. Evaluation of dog semen quality after slow (biological freezer) or rapid (nitrogen vapours) freezing. *Reprod. Nutr. Dev.* 45:29-37.
- Schäfer S. & Holzman A. 2000. The use of transmigration and Spermac® stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 59:201-211.
- Silva A.R., Cardoso R.S.C. & Silva L.D.M. 2006. Criopreservação do sêmen canino: revisão. *Ciênc. Anim.* 11:119-129.
- Silva A.R., Cardoso R.S.C. & Silva L.D.M. 2006. Influence of temperature during glycerol addition and post thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod. Domest. Anim.* 41:74-78.
- Silva M.A., Peixoto G.C.X., Santos E.A.A., Castelo T.S., Oliveira M.F. & Silva A.R. 2011. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology* 76:1084-1089.
- Soler A.J., Garcia A.J., Santos M.R.F., Esteso M.C. & Garde A.J.J. 2003. Effects

- of thawing procedure on post-thawed *in vitro* viability and *in vivo* fertility of red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *J. Androl.* 24:746-756.
- Tamayo-Canula J., Alvarez M.E., López-Urueña A., Nicolasa M., Martínez-Pastora F., Anela E., Anela L. & Paz P. 2011. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Anim. Reprod. Sci.* 126:76-82.
- Tsutsui T., Wada M., Anzai M. & Hore T. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J. Vet. Med. Sci.* 65:397-399.
- Uchoa D.C., Silva T.F.P., Cardoso J.F.S., Mota Filho A.C., Jucá R.P., Silva A.R. & Silva L.D.M. 2012. Favoring the birth of female puppies after artificial insemination using chilled semen diluted with powdered coconut water (ACP-106c). *Theriogenology* 77:1959-1963.
- Verstegen J., Iguer-Ouada M. & Onclin K. 2002. Computer assisted analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology* 57:149-179.
- 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.
- Yu I. & Leibo S. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology* 57:1179-1190.