

CONGELAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES RECUPERADOS DO EPIDÍDIMO DE CÃO (*Canis familiares*)

SPERMATOOZA FREEZING RECOVERED FROM DOG EPIDIDYMIS (Canis familiares)

Ivo Walter dos SANTOS¹, Luiz Carlos BINSFELD², Ingridy Müller WALTER³

Resumo

O presente estudo tem como objetivo avaliar o espermatozoide recuperado do epidídimo congelado/descongelado em diferentes diluidores. O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Setor Palotina no período de julho de 2017 a julho de 2019. Um mínimo de 40 CTE (complexo testículo epidídimo) de cães foi obtido de animais orquiectomizados. A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo foi realizada pela técnica de flutuação e submetida ao teste de swim-up para remoção dos resíduos celulares e espermatozoides inviáveis. Após a avaliação da concentração e motilidade, os espermatozoides foram diluídos pelo método “One Step” em Tris gema e/ou citrato gema e logo envazados em palhetas de 0,25mL numa concentração de 25×10^6 de espermatozoides viáveis. Logo as mesmas permaneceram em estabilização por 2 horas a temperatura de 5°C. Após foram colocadas em vapor de nitrogênio por 15 minutos, e por fim, mergulhadas no nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico. A descongelação foi realizada em banho maria a 37°C por um minuto, e após avaliou-se a motilidade e vigor em microscopia de Contraste de Fase 100x. Para avaliação da viabilidade espermática, foi utilizada a coloração vital Azul de Tripán/Giemsa. Na análise do sêmen descongelado, o diluente Tris-gema foi estatisticamente superior ao Citrato-gema nas variáveis motilidade, vigor e morfologia de espermatozoides epididimários de cão. O presente estudo, mostra que é possível recuperar e preservar espermatozoides provenientes do epidídimo de canídeos utilizando meio crioprotetor a base de tris-gema.

Palavras chaves: espermatozoide, epidídimo, cão.

¹ Departamento de Medicina Veterinária, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná-UFPR.
santosiw@ufpr.br

² Técnico Laboratório de Reprodução Animal, Setor Palotina Universidade Federal do Paraná-UFPR.

³ Estudante de Medicina Veterinária, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná-UFPR.

Abstract

The present study aims to evaluate sperm recovered from frozen / thawed epididymis in different extenders. The experiment was carried out in Animal Reproduction Laboratory at the Veterinary Hospital at the Palotina Sector from July 2017 to July 2019. A minimum of 40 ETC (epididymis testis complex) from dogs was obtained from orchiectomized animals. Epididymis tail sperm retrieval was performed by flotation technique and then submitted to the swim-up test to remove the unfeasible sperm and cellular waste. After evaluation of concentration and motility, the sperm were diluted by the "One Step" method in Tris yolk and / or citrate yolk and then packed in previously identified 0.25mL straws at a concentration of 25×10^6 viable sperm. Soon they remained in stabilization for 2 hours at 5°C . After that they were placed in nitrogen vapor for 15 minutes, and finally, dipped in liquid nitrogen and stored in cryogenic cylinder. The thawing was performed in a 37°C water bath for one minute, and then motility and vigor were evaluated by x100 magnification Phase Contrast microscopy. For sperm viability evaluation, the Tripan Blue/Giemsa vital stain was used. In the analysis of thawed semen, Tris-yolk extender was statistically superior to Yolk Citrate in the motility, vigor and morphology of dog epididymis sperm variables. The present study shows that it is possible to recovery and preserve sperm from the canid epididymis using tris-yolk cryoprotectant extender.

Key words: Spermatozoa, epididymis, dog.

Introdução e revisão bibliográfica

A necessidade de aproveitar a genética de carnívoros domésticos ou selvagens recém-mortos ou daqueles que não ejaculam por impotência Coewndi, a obtenção de espermatozoides da cauda do epididimo, pode ser uma alternativa para a reprodução assistida.

A extração de espermatozoides a partir do epidídimo é um método que oferece vantagens, sendo bastante utilizado em animais de difícil manejo, onde não é possível obter o sêmen ejaculado, e sua maior vantagem é que mesmo após a morte do doador, ainda há possibilidade de garantir células espermáticas viáveis a partir da cauda do epidídimo (Hori et al., 2015).

Técnicas interessantes para a conservação da biodiversidade estão sendo desenvolvidas, destacando-se a recuperação de espermatozoides do epidídimo de

animais mortos; esses gametas, assim recolhidos são capazes de resistir após diferentes períodos, quando resfriados, até serem, posteriormente, criopreservados (Martins et al., 2007; Goodrowe e Hay, 1993; Tsutsui et al., 2003).

Diversos estudos têm sido desenvolvidos com o objetivo de armazenar os testículos e os epidídimos, objetivando-se resgatar os gametas (Bruemmer et al., 2002; James et al., 2002; Yu e Leibo, 2002; Martins et al., 2009; Heise et al., 2010; Lone et al., 2011; Tamayo-Canul et al., 2011; Contri et al., 2012). Estudaram protocolos para adequar a possibilidade de retirada do complexo testículo epididimo e seu posterior acondicionamento em sistemas de transporte para seu envio a laboratórios especializados para processamento e criopreservação dos espermatozoides.

Após a morte do animal, os espermatozoides permanecem viáveis no epidídimo até que a degeneração tecidual post mortem afete sua viabilidade (Bruemmer et al., 2002; Muradás et al., 2006). Se os epidídimos forem armazenados a baixas temperaturas, a viabilidade espermática pode ser mantida por mais tempo (Bruemmer et al., 2002; James et al., 2002).

A criopreservação de espermatozoides do epidídimo tem sido usada em diferentes espécies: carneiro (Lone et al. 2011), cães (Hewitt et al., 2001; Martins et al., 2006), cervídeos (Hishimuna et al., 2003; Soler et al., 2003; Martinez-Pastor et al., 2005a; 2006; Fernández-Santos et al., 2009), (Ake-Lopez et al. 2010), cutias (Silva et al., 2011), garanhões (Bruemmer et al., 2002; Neild et al., 2006), gatos (Tebet et al., 2006; Titarelli et al., 2006; Axner et al., 2004), gazelas (Saragusty et al., 2006; Chatiza et al., 2011), homens (Oates et al., 1996), javalis (Kikuchi et al., 1998), esquilos (Ping et al., 2011), camundongos (Kishikawa et al., 1999; Sankai et al., 2001), touros (Martins et al., 2007) e varrões (Kolbe & Holtz, 1999).

O diluente a base de citrato de sódio mostrou uma motilidade progressiva dos espermatozoides após o descongelamento de 1,67%. O citrato de sódio é menos favorável à sobrevivência de espermatozoides de cães, uma vez que se percebe que a densidade do extensor é prejudicial à motilidade progressiva dos espermatozóides (santos et al.1999).

Apesar da queda significativa de motilidade e vigor, os espermatozoides coletados diretamente do epidídimo são considerados mais sensíveis ao congelamento, sendo normal uma diminuição considerável na integridade da membrana e na sobrevivência das células. Esta baixa resistência pode ser devido às diferenças funcionais e morfológicas entre o sêmen ejaculado e o recuperado do epidídimo, como a falta de exposição ao líquido prostático e a presença alta de gotas citoplasmáticas (Luvoni e Morselli, 2016).

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal do Setor Palotina no período de julho de 2017 a julho de 2019 para obter um mínimo de 40 CTE de cães.

Os CTE (complexo testículo epidídimo) foram obtidos de animais orquiectomizados em aulas práticas de anestesiologia e técnica operatória do Curso de Medicina Veterinária, realizadas no Hospital Veterinário do Setor Palotina da Universidade Federal do Paraná – UFPR.

Após a remoção dos CTEs os mesmos foram imersos em solução fisiológica 0,9% a 25°C e transportado em caixa térmica até o laboratório de Reprodução animal nessa mesma temperatura em um tempo médio de 15 minutos.

A recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo realizada pela técnica de flutuação relatada por Yu e 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 previamente 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 solução salina pré-aquecido a 37°C, deixando em repouso por 5 minutos, em seguida o referido conteúdo foi submetido ao teste de swim-up conforme Cesari, et al. (2006) para remoção dos resíduos celulares e espermatozoides inviáveis.

Avaliação espermática

Após, os espermatozoides foram resuspendidos em 1mL de Tris-gema ou Citrato-gema para avaliação da concentração (câmara de Neubauer), percentual de espermatozoides móveis e vigor, segundo CBRA (2013), Henry e Neves (1998), Salamon e Maxwell (2000). Após a avaliação os espermatozoides de cada epidídimo, os mesmos foram rediluídos para uma concentração de 50×10^6 / mL em Tris-gema e Citrato-gema respectivamente.

Congelação

Após a diluição pelo método “One Step” o sêmen foi envazado em palhetas de

0,25mL previamente identificadas, numa concentração de $12,5 \times 10^6$ de espermatozoides viáveis. Logo as mesmas permaneceram em estabilização por 2 horas a temperatura de 5°C. Após foram colocadas em vapor de nitrogênio por 15 minutos, e por fim, mergulhadas no nitrogênio líquido e armazenadas em botijão criobiológico.

Avaliação *in vitro* do sêmen descongelado

A descongelação foi realizada em banho maria a 37°C por um minuto, e após avaliou-se a motilidade e vigor em microscopia de Contraste de Fase 100x. Uma alíquota do sêmen foi incubada em banho maria a temperatura de 38°C por até 4 horas com intuito de avaliar a longevidade e resistência do espermatozoide.

Avaliação da viabilidade e reação acrossomal

Foram retiradas três amostras de 10 µL de sêmen de cada tubo para se proceder à coloração vital Azul de Tripán/Giemsa conforme descrições de Dias (2002), Santos (2004). Foram analisados 200 espermatozoides por lâmina e identificadas quatro classes distintas de espermatozoides: vivo intacto (VI); vivo com acrossoma reagido (VR); morto intacto (MI); morto com acrossoma reagido (MR).

Resultados e discussão

Os dados referentes à motilidade, vigor e morfologia de sêmen recuperado de eqüidímo de cão estão demonstrados na tabela 1.

A motilidade não apresentou diferença estatística entre sêmen fresco e diluído em tris-gema e citrato-gema no pré-congelamento. Porém, na análise do sêmen descongelado observou-se que tris-gema foi estatisticamente significativo sobre o citrato-gema. Essa diferença pode ser atribuída ao poder excitatório que o citrato exerce sobre o espermatozóide levando ao consumo de energia precoce da célula. Na tabela 1, observa-se que o vigor dos espermatozoides diluídos em citrato-gema foi superior àqueles diluídos em tris-gema e do próprio sêmen fresco, embora, sem significância estatística.

O vigor dos espermatozoides descongelados do diluidor tris-gema foram superior estatisticamente em relação aos descongelados do diluidor citrato-gema. Essa diferença atribui-se aos mesmos motivos já descritos no parágrafo acima.

O percentual de espermatozoides viáveis descongelados do diluidor tris-gema foi superior aos descongelados do diluidor citrato-gema. Acredita-se que esta diferença se deve a danos na membrana plasmática durante o processo de congelação corroborando com os achados de Santos et al. (1999) os quais relatam motilidade progressiva pó de 1,67% de sêmen canino congelado em diluente a base de citrato de sódio.

A morfologia considerando o percentual de espermatozoides viáveis descongelados quando comparados com o sêmen fresco, observa-se que houve uma perda significativa durante o processo de congelação concordando com os relatos de Luvoni, & Morselli, 2016. Estes autores detectaram baixa resistência funcional e morfológica do sêmen recuperado do epidídimo.

Tabela 1. Médias e desvio padrão das variáveis motilidade, Vigor e morfologia de sêmen fresco, pré-congelado e descongelado, recuperado do epidídimo de cão (n=40).

Diluentes	Variáveis		
	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Morfologia (%)
Sêmen fresco	74,66 (5,90)a	3,43 (0,48)a	63,96 (5,18)a
Tris-gema pré-cong.	74,66 (5,90)a	3,43 (0,48)a	63,96 (5,18)a
Citrato-gema pré-cong.	74,66 (5,90)a	3,73 (0,48)a	63,96 (5,18)a
Tris-gema descong.	50,00 (6,09)b	3,40 (0,47)a	59,46 (5,62)b
Citrato-gema descong.	30,66 (4,35)c	1,73 (0,56)b	45,93 (5,22)c

Letras a,b,c nas colunas indicam significância ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

As classes morfológicas resultantes da coloração vital Azul de Tripán/Giemsa de sêmen recuperado de epidídimo de cão estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2. Médias e desvio padrão da viabilidade e reação acrossomal de espermatozoides recuperados de epidídimo de cão (n=40).

Diluentes	Classes morfológicas (%)			
	VI	VR	MI	MR
Semen fresco	63,96 (5,18)a	10,42 (1,93)b	14,32 (2,08)b	11,30 (1,98)b
Tris-gema	59,46 (5,62)b	18,40 (2,78)a	8,50 (1,53)c	13,64 (2,31)b
Citrato-gema	45,93 (5,22)c	9,43 (1,78)b	24,08 (2,96)a	16,56 (2,74)a

Letra a,b,c nas colunas indicam significância ($P < 0,05$) pelo teste Tukey.

VI=vivo intacto, VR=vivo acrossoma reagido, MI=morto intacto, MR=morto acrossoma reagido.

Na classe VR observa-se que houve reação acrossomal dos espermatozoides vivos, mostrando que o Tris-gema foi significativamente superior ao citrato-gema durante o processo de congelação, assemelhando-se às técnicas e resultados de Dias (2002), Santos (2004), embora, estes autores trabalharam com sêmen ejaculado.

A percentagem de MI relacionado ao citrato-gema confirma que o referido diluente causa exitação levando ao esgotamento energético bem como, danos à membrana plasmática dos espermatozoides levando-os à morte antes da reação acrossomal. Os dados da tabela 2 em relação aos diluidores especificamente, o citrato-gema, corrobora com as descrições de Santos et al. (1999) e Luvoni, & Morselli (2016).

Os resultados encontrados no presente estudo, mostra que é possível recuperar e preservar espermatozoides provenientes do epidídimo de canídeos utilizando meio crioprotetor à base de tris-gema. Outras técnicas de coleta e meios diluidores devem ser estudados para melhorar o desempenho do sêmen criopreservado para aumentar os índices de sucesso na reprodução assistida dos canídeos domésticos e selvagens de cativeiro na preservação das espécies.

Referências

- AKE-LOPEZ J. CAVAZOS-ARIZPE E., MAGANA-MONFORTE J.G., CENTURION-CASTRO F. & SILVA-MENA C. Effect of age and postmortem time on some white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) epididymal sperm characteristics and response of cryopreservation. **American Journal of Animal and Veterinary Sciences**. v.5, p.183-186, 2010.
- AXNÉR E., HERMANSSON U. & LINDE-FORSBERG C. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v.84, p.179-191, 2004.
- BRUEMMER J.E., REGER H., ZIBINSKI G. & SQUIRES E.L. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. **Theriogenology**. v.58, p.405-407, 2002.
- CBRA. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3 ed. Belo Horizonte: **CBRA**, 2013.
- CESARI, A, KAISER, GG, MUCCI, N, MUTTO, A, VINCENTI, A, FORNE'S, MW, ET AL. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**. v.66,p.1185-93, 2006.
- CHATIZA F.P., PIETERSE G.M., BARTELS P & NEDAMBALE T.L. Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphology and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcus phillipsi*): Pre- and post-cryopreservation in South Africa. **Animal Reproduction Science**. v.126, p.234-244, 2011.

CONTRI A., GLORIA A., ROBBE D., I. DE AMICIS I & CARLUCCIO A. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. **Theriogenology**. v.77, p.166-173, 2012.

DIAS, D.L. **Estudo morfofisiológico de componentes protéicos para caracterizar diferenças entre espermatozoides do ejaculado e epidídimo, em bovinos**. Dissertação Mestrado. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil; 2002.

FERNÁNDEZ-SANTOS M.R., MARTINEZ-PASTOR F., MATIAS D., DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO A.E., ESTESO M.C., MONTORO V. & GARDE J.J. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v.111, p.93-104, 2009.

GOODROWE K.L & HAY M. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymalspermatozoa. **Theriogenology**. v.40, p.967-975, 1993.

HEISE A., KÄHN W., VOLKMANN D.H., THOMPSON P.N. & GERBER D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. v.118, p.48-53, 2010.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1998. 49p.

HEWITT D.A., LEAHY R., SHELDON I.M. & ENGLAND G.C. Cryopreservation of epididymal dog sperm. **Animal Reproduction Science**. v.67, p.101-111, 2001.

HISHINUMA M., SUZUKI K. & SEKINE, J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. **Theriogenology**. v.59, p.813-820, 2003.

HORI, T.; ATAGO, T.; KOBAYASHI, M.; KAWAKAMI, E. Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality. **Journal of Veterinary Medical Science Laboratory of Reproduction, Nippon Veterinary And Life Science University**. v.8, p. 625-630, 2015.

JAMES A.N., GREEN H., HOFFMAN S., LANDRY A.M., PACCAMONTI D. & GODKE R.A. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. **Theriogenology**. v.58, p.401-404, 2002.

KIKUCHI K., NAGAI T., KASHIWAZAKI N., IKEDA H., NOGUCHI J & SHIMADA A. Criopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. **Theriogenology**. v.50, p.615-623,1998.

KISHIKAWA H., TATENO H & YANAGIMACHI R. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. **Journal of Reproduction and Fertility**.

v.116, p.217-222, 1999.

KOLBE T & HOLTZ W. Intracytoplasmic injection(ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozenthawed epididymal spermatozoa and additional calciumionophore activation in the pig. **Theriogenology**. v.52, p.671-682, 1999.

LONE F.A., ISLAM R. , KHAN M.Z. , SOFI K.A. . Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of ram. **Animal Reproduction Science**. v.123, p.54-59, 2011.

LUVONI, G. C.; MORSELLI, M. G. Canine epididymal spermatozoa: A hidden treasure with great potential. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, p.197-201, 2016.

MARTINEZ-PASTOR F., CORUJO A.R.D., ANEL E., HERRAEZP., PAZ, P & ANEL L. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. **Theriogenology**. v.64, p.958-974, 2005a.

MARTINEZ-PASTOR F., GUERRA C., KAABI M., DIAZ A.R., ANAL E., HERRAEZ P., & PAZ P., ANEL, L. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**. v.63, p.24-40,2005b.

MARTINEZ-PASTOR F., GARCIA-MACIAS V., ALVAREZ M., CHAMORRO C., HERRAEZ P., PAZ P & ANEL L. Comparison of twomethods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymisof Iberian red deer. **Theriogenology**. v.65, p.471-485, 2006.

MARTINS C.F., RUMPF R., PEREIRA D.C & DODE M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**. v.101, p.326-331, 2007.

MARTINS C.F., DRIESSEN K., COSTA P.M., CARVALHO-NETO J.O., SOUSA R.V., RUMPF R & DODE M.N. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**. v.116, p.50-57,2009.

MARTINS M.I.M., JUSTINO R.C., PEREIRA F.D., PERCHES C.S., CHIRINÉA V.H & LOPES M.D. The effect of two solutions in the morphological characteristics and in the freezing of spermatozoa obtained from epididymis of dogs and cats: preliminary results. **Animal Reproduction**. v.3, p.265, 2006.

MURADÁS P.R., WEISS R.R., KOZICKI L.E., GRANEMANN L.C., SANTOS I.W & PIMPÃO C.T. alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. **Archives of Veterinary Science**. v.11, p.69-74, 2006.

NEILD D., MIRAGAYA M., CHAVES G., PINTO M., ALONSO A., GAMBAROTTA M., LOSINNO L & AGÜERO A. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from

slaughterhouse testicles 24 hours after ground transportation. **Animal Reproduction Science**. v.94, p.92-95, 2006.

OATES R.D., LOBEL S.M., HARRIS D.H., PANG S., BURGESS C.M & CARSON R.S. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. **Human Reproduction**. v.11, p.133-138, 1996.

PING S., WANG F., ZHANG F., WU C., TANG W., LUO Y. & YANG S. Cryopreservation of epididymal sperm in tree shrews (*Tupaia belangeri*). **Theriogenology**. v.76, p.39-46, 2011.

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

SANKAI T., TSUCHIYA H & OGONUKI N. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. **Theriogenology**. V55, p.1759-1768, 2001.

SANTOS S.E. C.; VANNUCCHI C.I.; SATZINGER S.; ASSUMPÇÃO M.E.O.A; VISINTIN J.A. Comparison of five extenders for canine semen freezing . **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.** v..36, p.54-59, 1999.

SANTOS, I.W. **Albumina sérica bovina como fonte protéica do diluidor tris (hidroximetil amino metano) para congelação do sêmen canino**. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004, 63 p.

SARAGUSTY J., GACITUA H., KING R & ARAV A. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). **Theriogenology**. v. 66, p.775-784, 2006.

SILVA M.A., G.C.X. PEIXOTO., E.A.A. SANTOS., T.S. CASTELO., OLIVEIRA M.F. & SILVA A.R. . Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. **Theriogenology**. v.76, p.1084-1089, 2011.

SOLER A.J., GARCIA A.J., FERNÁNDEZ-SANTOS M.R., ESTESO M.C & GARDE J.J. Effects of thawing procedure on postthawed in vitro viability and in vivo fertility of Red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. **Journal of Andrology**. v.24, p.746-756, 2003.

TAMAYO-CANUL J., ALVAREZ M., LÓPEZ-URUEÑA E., NICOLAS M., MARTINEZ-PASTOR F., ANEL E., ANEL L.& DE PAZ P. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. **Animal Reproduction Science**. v.126, p.76-82, 2011.

TEBET J. MARTINS M.I.M., CHIRINÉA V.H., SOUZA F.F., CAMPAGNOL D & LOPES M.D.

Cryopreservation effects on domestic cat. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, p.1-8, 2006.

TITTARELLI C., SAVIGNONE C.A., ARNAUDÍN E., STORNELLI M.C., STORNELLI M.A & DE LA SOTA R.L. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**. v.66, p.1637-1640, 2006.

TSUTSUI T., WADA M., ANZAI M & HORI T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.65, p.397-399, 2003.

YU I. & LEIBO S. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. **Theriogenology**. v.57, p.1179-1190, 2002.