

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

LARISSA BATTALIONE FRANCO

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO PARA
TRANSPORTE DE TESTÍCULOS DE CÃES DESTINADOS À COLETA DE SÊMEN
DO EPIDÍDIMO**

UBERLÂNDIA - MG

2019

LARISSA BATTALIONE FRANCO

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO PARA
TRANSPORTE DE TESTÍCULOS DE CÃES DESTINADOS À COLETA DE SÊMEN
DO EPIDÍDIMO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de Curso II.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Aracéle Elisane Alves.

UBERLÂNDIA - MG

2019

LARISSA BATTALIONE FRANCO

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES MÉTODOS DE CONSERVAÇÃO PARA
TRANSPORTE DE TESTÍCULOS DE CÃES DESTINADOS À COLETA DE SÊMEN
DO EPIDÍDIMO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao curso de graduação em Medicina Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à aprovação na disciplina de Trabalho de conclusão de Curso II.

Uberlândia, 11 de Julho de 2019.

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a Aracéle Elisane Alves
Universidade Federal de Uberlândia

Prof.^a Dr.^a Teresinha Inês de Assumpção
Universidade Federal de Uberlândia

M.V Mestranda Camila Neves Martins
Universidade Federal de Uberlândia

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Carlos e Simone, e minha irmã, Letícia, por me apoiarem e aguentarem todos os dias desde o começo da graduação e em especial durante o desenvolvimento do projeto. Obrigada por me ouvirem mesmo sem compreender muito bem o que eu falava.

Agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Aracéle Elisane Alves por toda paciência no decorrer deste projeto e a dedicação em me ensinar. Todas as lições que me passou levarei para minha vida profissional e pessoal.

Agradeço à Prof.^a Dr.^a Teresinha Inês de Assumpção, por aceitar o convite para participar da banca e deixar o Laboratório de Reprodução Animal da UFU à disposição, e à equipe do laboratório por me ajudarem na realização de algumas etapas do experimento.

Agradeço a mestranda Camila Neves Martins, por me ajudar no desenvolvimento do projeto e por aceitar o convite para participar da banca.

Agradeço a equipe de orientados da Prof.^a Aracéle: Bruna, Ranyne, Vinícius e Wesley, aos meus colegas de prática hospitalar: Ana Lícia, Lana, Mábia e Roger, à estagiária Pâmella, e também aos residentes da Clínica Cirúrgica do Hospital Veterinário da UFU: Ana Clara, Beatriz, Brunna, Gustavo, Larissa, Lucas, Marcella e Raphael, por participarem e me ajudarem nos dias mais corridos do experimento.

Agradeço à diretoria do Hospital Veterinário da UFU por disponibilizar o espaço e os materiais para a realização do experimento. Ao Prof. Dr. Cirilo Antônio de Paula Lima por autorizar e ajudar em minhas coletas no projeto de castração. Ao Prof. Dr. Francisco Cláudio Dantas Mota e ao Prof. Dr. Felipe Silveira Rego Monteiro de Andrade por me permitirem realizar coletas durante suas aulas práticas.

Por fim, agradeço ao Oliver, por me fazer optar corretamente pela medicina veterinária, por ser minha força para chegar até aqui e minha maior inspiração em continuar.

RESUMO

A fauna está cada vez mais ameaçada de extinção por inúmeros fatores, este fato torna necessários estudos de técnicas de conservação do material genético que viabilizem a recuperação e manutenção de espécies em risco, no entanto, poucos estudos relatam métodos eficazes para a conservação deste material por longos períodos sem ocorrência de perda significativa em sua viabilidade, principalmente quando há necessidade de coletas emergenciais de amostras provenientes de animais mortos. O objetivo desse estudo foi avaliar diferentes métodos de conservação do complexo testículo-epidídimo destinado a coleta de sêmen epididimário de cães, afim de identificar qual método oferece melhor conservação da amostra seminal. Foram coletados após orquiectomia os testículos de 22 cães adultos, hígidos, sem restrições definidas à raça ou peso. Os testículos foram alocados aleatoriamente em três grupos, onde cada grupo foi destinado a um tipo de transporte diferente e os grupos subdivididos de acordo com o tempo de transporte. Foram feitas as avaliações macroscópicas de volume, cor e microscópicas que incluíram motilidade, vigor, concentração e patologias espermáticas. Os resultados obtidos dos testículos direitos imediatamente após orquiectomia foram considerados controle; comparados com os obtidos dos testículos esquerdos provindos do mesmo animal, com o propósito de observar e comparar as diferenças ocorridas durante as análises nos diferentes intervalos de tempo. Após as análises foi possível observar que a caixa de isopor se revelou mais eficiente do que a bolsa térmica para a conservação de complexos testículos-epidídimos, tendo uma menor perda nos parâmetros seminais, sendo então o método de conservação mais indicado para transporte de testículos destinados a coleta de sêmen do epidídimo.

Palavras-chave: Cães. Sêmen. Epidídimos.

ABSTRACT

The fauna is increasingly threatened with extinction by many factors, this fact makes necessary studies of techniques of conservation of the genetic material that enable the recovery and maintenance of endangered species, however, few studies report effective methods for the conservation of this material by long periods without significant loss of viability, especially when there is a need for emergency collection of samples from dead animals. The objective of this study was to evaluate different methods of preservation of the testis-epididymis complex for the collection of epididymal semen from dogs, in order to identify which method offers better conservation of the seminal sample. The testicles were collected after orchietomy of 22 healthy adult dogs with no defined restrictions to breed or weight. The testes were randomly allocated into three groups, where each group was assigned to a different type of transport and the groups subdivided according to the transport time. Macroscopic volume, color and microscopic evaluations were performed, including motility, vigor, concentration and spermatic pathologies. Results obtained from right testicles immediately after orchietomy were considered control; compared to those obtained from the left testicles from the same animal, in order to observe and compare the differences that occurred during the analyzes at different time intervals. After the analysis, it was possible to observe that the Styrofoam box proved to be more efficient than the thermal bag for the preservation of the testes-epididymis complex, with a lower loss in the seminal parameters. collection of semen from the epididymis.

Key words: Dogs. Semen. Epididymis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Queda da motilidade de complexos testículos-epidídimos após conservação em caixa de isopor e bolsa térmica.....22
- Figura 2** – Queda de vigor de complexos testículos-epidídimos após conservação em caixa de isopor e bolsa térmica.22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação quanto ao vigor.....	13
Tabela 2 – Média dos parâmetros espermáticos encontrados das análises da amostra seminal epididimário conservadas em caixas de isopor.....	19
Tabela 3 – Média dos parâmetros espermáticos encontrados das análises da amostra seminal epididimária conservadas em bolsa térmica.	21
Tabela 4 – Média dos parâmetros espermáticos encontrados das análises da amostra seminal epididimária conservadas em temperatura ambiente.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	10
2.1 O epidídimo	10
2.2 Espermatogênese	10
2.3 Coleta de espermatozoides epididimários	11
2.4 Conservação de espermatozoide epididimários.....	12
2.5 Análise do sêmen.....	12
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Pré-operatório	14
3.3 Protocolo anestésico	14
3.3.1 Medicação pré-anestésica (MPA).....	14
3.3.2 Indução e Manutenção.....	14
3.4 Preparo do campo cirúrgico.....	14
3.5 Procedimento cirúrgico.....	15
3.5.1 Orquiectomia	15
3.6 Grupos experimentais	15
3.7 Controle de temperatura	16
3.8 Coleta do sêmen da cauda do epidídimo	16
3.9 Análise do sêmen da cauda do epidídimo	16
3.10 Análise e comparação dos resultados	17
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

Atualmente observa-se que os métodos de conservação dos recursos da diversidade biológica não são capazes de evitar o crescente perigo de extinção de espécies e, sobretudo, a perda da variabilidade genética. Assim sendo, faz-se mister que novas formas de conservação desses recursos sejam incorporadas àquelas já em uso, com a finalidade de diminuir, ao máximo, essas perdas irreversíveis.

Nos últimos anos, diversas técnicas que viabilizam a obtenção de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo estão em desenvolvimento, visando o aproveitamento do material genético de reprodutores com genótipos superiores e de espécies silvestres ameaçadas de extinção com mortes acidentais ou não (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2009). Os métodos de coleta de gametas a partir do epidídimo, tem buscado proporcionar vantagens semelhantes a outras formas de recolhimento do material, onde estes continuam morfológicamente viáveis e mantêm íntegra sua capacidade de capacitação e fertilização (TSUTSUI, 2003).

Após a retirada cirúrgica do conjunto testículo-epidídimo em cães, seus espermatozoides continuam viáveis por um período de aproximadamente 24 horas em temperatura ambiente, no entanto, sua viabilidade espermática pode ser mantida por mais tempo se a amostra for armazenada em baixas temperaturas (BRUEMMER et al., 2002; JAMES et al., 2002). Diversos autores relatam que o período de viabilidade dos espermatozoides recuperados é maior quando o epidídimo é previamente refrigerado a 5°C (NICHI et al., 2016).

Apesar da crescente necessidade do transporte de amostras de materiais genéticos provenientes de animais em risco de extinção, poucos estudos demonstram maneiras eficazes que possam amenizar os obstáculos tais como longos transportes, que diversas vezes causam o comprometimento da viabilidade espermática (NAGAO et al., 2007).

Por esse motivo, pesquisas têm investido no aprimoramento de métodos para refrigeração por longos períodos capazes de garantir a boa qualidade espermática.

Devido a evidente semelhança reprodutiva entre os caninos domésticos e caninos silvestres, o avanço no método de conservação do material genético de cães atualmente tem sido base de estudos para preservação de canídeos selvagens em risco de extinção.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar diferentes métodos de conservação do complexo testículo-epidídimo destinado a coleta de sêmen epididimário de cães, buscando conhecer qual método oferece melhor conservação da amostra seminal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O epidídimo

O epidídimo é dividido em três regiões, a cabeça, o corpo e a cauda (OLIVA, RINALDO, STUMPP, 2009) conectando o ducto eferente ao ducto deferente e encarregados pela maturação espermática. É através deste órgão que as células espermáticas adquirem sua motilidade e capacidade para fecundação, visto que são imaturas e não apresentam motilidade própria logo após serem produzidas (ARROTÉIA et al., 2012).

No cão, a estrutura é formada por um longo ducto enovelado revestido por epitélio pseudoestratificado (ORSI, 1983). O epitélio é responsável pela secreção de proteínas que propiciam um ambiente ideal para a maturação dos espermatozoides, fornecendo temperatura, pH, energia e oxigênio suficientes para as células.

Dentre as funções do epidídimo, ressaltam-se a reabsorção dos fluidos provindos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração e o transporte espermático, a eliminação dos espermatozoides anormais, bem como a maturação e o armazenamento dos normais (ANGRIMANI et al., 2013). A cauda do epidídimo é responsável pelo armazenamento destas células, por apresentar baixo metabolismo, evitando a ativação prematura das células e mantendo-as vivas entre três a cinco dias (MARADÁS et al., 2006).

2.2 Espermatogênese

A espermatogênese é um processo de diferenciação celular, onde uma espermatogônia é diferenciada em uma célula haploide, o espermatozoide. Ela ocorre nos túbulos seminíferos e em cães a duração de cada ciclo é aproximadamente de 14 dias (FOOTE; SWIERSTRA; HUNT, 1972).

A espermatogênese pode ser dividida em três fases distintas nos adultos, sendo elas a mitótica, a meiótica e a espermiogênese, onde cada uma é caracterizada por mudanças morfológicas e químicas dos componentes do citoplasma e núcleo celular (COUROT; HOCHEREAU-DEREVIERS; ORTAVANT, 1970).

Durante a fase mitótica as células tronco dão origem a duas outras, onde uma delas vai ser encarregada da renovação da população de células tronco e a outra entra no processo espermatogênico. Esta, por sua vez vai dar origem à espermatogônia intermediária, que se divide para formar as espermatogônias B. No final da divisão, as espermatogônias B dão origem

a outras células que entram em fase de meiose como espermatócitos em pré leptóteno. Essas células posteriormente serão assimiladas dentro do compartimento adluminal do epitélio seminífero (RUSSELL, 1990). Todos os tipos celulares subsequentes vão ficar no compartimento adluminal, não tendo acesso diretamente a nutrientes e hormônios, dependendo das células de Sertoli para prover suas necessidades (RUSSELL; GRISWOLD, 1993).

A fase meiótica envolve síntese de DNA nos espermatócitos em pré leptóteno, síntese de RNA em espermatócitos em paquíteno e no final da meiose há formação das espermátides haploides (PARVINEN et al., 1991).

Na terceira fase da espermatogênese, as espermátides se diferenciam por meio de uma série de modificações morfológicas progressivas em espermatozoides, o processo é denominado como espermiogênese. Estas modificações incluem desenvolvimento do acrossoma, condensação e alongamento do núcleo e formação da cauda espermática (RUSSELL et al., 1990).

2.3 Coleta de espermatozoides epididimários

Diversos métodos de coleta de gametas diretamente do epidídimo são descritos conforme a espécie e os pesquisadores. Essas coletas foram previamente relatadas em suínos (KIKUCHI et al., 1998), bovinos (MARTINS et al., 2009), equinos (PAPA et al., 2008), felinos (JIMÉNEZ, et al., 2011) e caninos (YU; LEIBO, 2002; PONGLOWHAPAN et al., 2006). O material adquirido por esses meios continua viável morfolologicamente e com sua capacidade de capacitação e fertilização (TSUTSUI, 2003).

Nos animais de companhia, devido ao tamanho do epidídimo os métodos mais utilizados são o de fatiamento, que consiste em fatiar a cauda do epidídimo e deixar repousar em um meio diluidor, onde os espermatozoides migram para o meio sendo posteriormente recuperados através de filtração (YU; LEIBO, 2002), e a lavagem retrógrada, onde um fluxo retrógrado é promovido na cauda do epidídimo por meio de pressão dos vasos deferentes através de uma seringa até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (GARDE et al., 1994).

Outra técnica antes relatada em camundongos por Kishikawa, Tateno e Yanagimachi (1999) vem sendo aplicada para a coleta de espermatozoides epididimários em pequenos animais. Esta consiste em recuperar os espermatozoides por meio de compressão da cauda do epidídimo com pinças hemostáticas. Estudos recentes demonstram maior facilidade na

execução desta técnica quando a mesma é modificada, substituindo as pinças hemostáticas por lâminas de vidro (SAVI et al., 2015).

2.4 Conservação de espermatozoide epididimários

A conservação espermática permite o prolongamento do período de viabilidade espermática da amostra. A conservação do sêmen canino em baixas temperaturas tem sido relatada em refrigeradores convencionais (PONGLOWHAPAN; ESSÉN-GUSTAVSSON; LINDE-FORSBERG, 2004), garrafas térmicas (PINTO; PACCAMONTI; EILTS, 1999), recipientes térmicos comerciais (NAGAO et al., 2007), e caixas isotérmicas de poliestireno expandido (SILVA et al., 2004), sendo que essas últimas vêm sendo utilizadas sem regulamentação como uma alternativa viável e de baixo custo. O período de conservação máximo que este método permite sem que haja perda da qualidade seminal ainda não é amplamente estudado.

A refrigeração dos espermatozoides da cauda de epidídimo pode ser realizada de duas formas: quando o complexo testículo-epidídimo é refrigerado inteiro ou quando os espermatozoides são recuperados e posteriormente refrigerados (BERGSTEIN-GALAN et al., 2017).

Um estudo feito em Ovinos por Tamayo-Canul et al. (2011), compara a refrigeração do epidídimo inteiro antes da recuperação espermática com a refrigeração de espermatozoides colhidos, diluídos e refrigerados a 5°C. Os resultados relatando que os espermatozoides diluídos demonstram superioridade quando comparados aos espermatozoides mantidos em epidídimos refrigerados, porém, também apresentam maior porcentagem de lesão de acrossoma.

2.5 Análise do sêmen

O sêmen é avaliado quanto suas características físicas, como volume, aspecto (cor e densidade), motilidade, vigor e concentração. A avaliação de volume é feita logo após a coleta e junto a esta é realizada a análise de aspecto por observação visual subjetiva. A concentração espermática é efetuada pela contagem de espermatozoides utilizando a câmara de Neubauer, a motilidade e o vigor são observados através da microscopia óptica, com aumento de 100x, expressando respectivamente a porcentagem total de espermatozoides moveis e a força do movimento destes.

A motilidade espermática, é um dos parâmetros mais utilizados para a avaliação de espermatozoides, sejam eles frescos ou conservados (PEÑA, 1997). A motilidade é uma das características necessárias ao espermatozoide para fertilização, apesar da correlação entre a motilidade e fertilidade ainda não estar totalmente esclarecida (SOUZA, 2003). Sêmen canino fresco e congelado de qualidade aceitável deve apresentar $\geq 70\%$ e $\geq 50\%$ de motilidade, respectivamente (CBRA, 2013).

O vigor é caracterizado como a qualidade do movimento dos espermatozoides móveis em uma escala de 1 – 5 (CBRA, 2013), sendo um parâmetro avaliado juntamente com a motilidade. O vigor de espermatozoides caninos deve ser no mínimo 3 (CBRA, 2013).

Tabela 1 – Classificação quanto ao vigor.

Escore	Definição
5	Progressivo retilíneo muito rápido
4	Progressivo retilíneo rápido
3	Intermediário
2	Lento
1	Exclusivamente oscilatório

Fonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (2013)

Também são feitas avaliação morfológicas do sêmen, onde as anormalidades encontradas podem ser classificadas quanto “de cabeça” e “de peça intermediária” ou “de cauda”, ou ainda podem ser classificados em defeitos maiores e menores. As anormalidades ainda podem ser divididas em defeitos maiores, que têm grande efeito na fertilidade, e menores, considerados de menor importância (BLOM, 1972). Este teste pode ser realizado por meio de esfregaços corados sob microscopia óptica ou de preparação úmida sob microscopia de contraste de fase (CBRA, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados os complexos testículos e epidídimos de 22 caninos, sem raça definida, adultos, cadastrados no projeto de castração desenvolvido por meio de um convênio entre a Prefeitura Municipal de Uberlândia e Universidade Federal de Uberlândia, sendo os procedimentos cirúrgicos realizados nas dependências do Hospital Veterinário UFU.

3.2 Pré-operatório

No dia anterior ao procedimento, os animais foram submetidos ao exame clínico e laboratorial (Hemograma completo, dosagens séricas de alanina aminotransferase e creatinina). Apenas os animais considerados hígidos foram utilizados no estudo. Foi realizado jejum alimentar de doze horas e hídrico de quatro horas.

3.3 Protocolo anestésico

Todos os animais foram submetidos ao mesmo protocolo anestésico.

3.3.1 Medicação pré-anestésica (MPA)

- Acepromazina 0,2%, 0,05 mg/kg; Midazolam, 0,5 mg/kg; Tramadol, 4 mg/kg; Cetamina, 10 mg/kg. Todos em uma mesma seringa por via intramuscular.

3.3.2 Indução e Manutenção

- Cetamina, 10 mg/kg e propofol 5mg/kg por ambos administrados em *bolus* por via intravenosa.

3.4 Preparo do campo cirúrgico

Após a aplicação da medicação pré-anestésica (MPA) foi realizada a tricotomia ampla da região pré-escrotal, seguida da limpeza e assepsia prévia, com auxílio de álcool e clorexidine alcoólica.

3.5 Procedimento cirúrgico

3.5.1 Orquiectomia

O procedimento de orquiectomia pré-escrotal utilizado seguiu a técnica descrita por Fossum (2005). Foi feita uma pressão suficiente sobre o escroto para deslocar um dos testículos para a região pré-escrotal. A pele e o subcutâneo foram incididos ao longo da rafe mediana sobre o testículo deslocado, sendo a incisão continua através da fáscia espermática até exteriorizar o testículo, seguida da incisão da túnica vaginal parietal. Com o auxílio dos dedos, o ligamento foi separado da cauda do epidídimo a partir da túnica. O testículo foi exteriorizado através de aplicação de tração caudal sobre o mesmo. As estruturas do cordão espermático foram identificadas e com um fio de sutura de algodão foi realizada a ligadura do ducto deferente e plexo pampiniforme logo abaixo a pinça hemostática, transecciona-se entre a pinça hemostática e a ligadura. O cordão foi avaliado quanto a hemorragias e seguida com a reposição do mesmo dentro da túnica. O mesmo procedimento foi realizado no testículo contralateral. Por fim, foram realizadas suturas das fáscias densas, subcutâneo e pele com fio de nylon.

3.6 Grupos experimentais

Após orquiectomia os testículos foram lavados em solução fisiológica de NaCl a 0,9% a temperatura ambiente e envoltos em gases estéreis umedecida com a mesma solução. Logo em seguida foram alocados em sacos plásticos o material de cada animal individualmente e divididos aleatoriamente em três grupos, onde cada grupo foi transportado de acordo com seu respectivo grupo de método de conservação até o laboratório, sendo: grupo "A": testículos transportados em caixa de isopor sobre gelo; grupo "B": transporte de testículos em bolsa térmica sobre gelo e "C": transporte de testículos em temperatura ambiente.

Imediatamente após a remoção, os testículos dos grupos A e B foram subdivididos em quatro subgrupos, contendo 2 pares de testículos cada, sendo os testículos esquerdo analisados respectivamente decorridas 4h, 6h, 8h e 12h após a orquiectomia. Os testículos do grupo C foram subdivididos em três subgrupos, também com 2 pares de testículo para cada subgrupo,

analisado o sêmen após 2h, 3h e 4h. Em todos os grupos os testículos direitos foram destinados à coleta do sêmen da cauda do epidídimo imediatamente após a orquiectomia servindo como parâmetros de controle para as análises.

3.7 Controle de temperatura

Foram acrescentadas 2 unidades de gelo reutilizável de 250 ml 5 horas antes do armazenamento dos complexos testículos-epidídimos, a fim de garantir que os recipientes já estivessem em uma temperatura próxima a 5 °C no momento da conservação. Neste momento, os gelos reutilizáveis foram trocados por novos, de mesmo volume, com o objetivo de manter a temperatura do recipiente ao longo de 12 horas.

Além disso, em cada recipiente foi acrescentado um termômetro de capela, para realizar as aferições de temperaturas máximas e mínimas nesse período, sendo estes colocados juntos da primeira leva de gelo, 5 horas antes dos procedimentos. As aferições de temperaturas máximas foram restauradas quando os primeiros complexos de cada recipiente foram alocados.

3.8 Coleta do sêmen da cauda do epidídimo

A coleta do sêmen foi realizada pela técnica modificada de compressão da cauda do epidídimo por lâmina de vidro, descrita por Savi et al. (2015).

A cauda do epidídimo e o ducto deferente foram dissecados do testículo com uma lâmina de bisturi, uma pinça hemostática foi colocada em cada uma de suas extremidades. Uma placa de Petri estéril foi posicionada em 45° graus e logo em seguida colocados 500 µL de ringer simples a temperatura ambiente em sua borda. A cauda do epidídimo juntamente com o ducto deferente foi posicionada sobre a placa de forma que a extremidade do ducto deferente permaneceu em contato com o interior da gota.

A compressão foi feita com uma lâmina de vidro no sentido da cauda do epidídimo para o ducto, guiando os espermatozoides até o ringer, sendo o mesmo procedimento realizado três vezes em cada epidídimo. A gota contendo os espermatozoides foi recuperada com uma pipeta plástica e logo em seguida armazenada em eppendorf para ser analisada.

3.9 Análise do sêmen da cauda do epidídimo

Imediatamente após a coleta, foi realizada a avaliação macroscópica do sêmen quanto ao aspecto por meio de observação visual. As análises físicas foram realizadas em seguida utilizando 50 µL do sêmen coletado sobre a lâmina de vidro recoberta com lamínula por meio de um microscópio óptico, avaliando a motilidade progressiva e o vigor espermático.

A concentração de células/ml foi avaliada através da câmara de Neubauer. Foi utilizada uma diluição de 50 µL de sêmen para 950 µL de formol salina. Foram retirados 20 µL da diluição e utilizados para preencher os dois retículos da câmara, onde foram contados todos os espermatozoides presentes em 5 quadrados de cada retículo, respeitando a padronização de serem contados aqueles na linha lateral esquerda e linha inferior do quadrante.

O resultado final foi obtido seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Concentração espermática} = \frac{n}{\frac{1}{10} \times \frac{5}{25} \times \frac{1}{20}} \text{ espermatozoides/mm}^3$$

A avaliação morfológica do sêmen foi realizada utilizando o método de lâmina corada com rosa bengala. Uma gota da amostra de sêmen diluída foi colocada sobre a lâmina e uma gota do corante colocada ao lado, com auxílio de outra lamina ambos foram combinadas e se realizou o esfregaço da amostra final, fazendo a análise de 100 células logo em seguida, verificando a porcentagem de anormalidades maiores e menores (BLOM, 1972).

3.10 Análise e comparação dos resultados

Após a obtenção dos resultados das análises dos testículos esquerdos, estes foram comparados àqueles adquiridos com os testículos direitos (controle) dos receptivos animais imediatamente após a orquiectomia.

Com a observação destes dados, os resultados foram tabulados para se comparar os resultados obtidos por cada grupo e subgrupo, a fim de evidenciar quais os grupos tiveram melhor desempenho, menor queda da qualidade e que se mantiveram viáveis por um maior período.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante o período de conservação, a temperatura mínima registrada pelos termômetros de capela foi de 10 °C, demonstrando que os recipientes usados não foram capazes de manter temperaturas abaixo desta, mesmo quando a quantidade de gelo era aumentada (750 mL de gelo reutilizável) ou mesmo dobrada (1000 mL de gelo reutilizável).

Apesar de estudos terem esclarecido que a temperatura mais indicada para a conservação do epidídimo é de 5 °C (NICHII et al., 2016), a fim de reduzir os danos causados na viabilidade espermática, os recipientes utilizados no experimento não foram capazes de atingir esta temperatura.

No que se diz respeito sobre a conservação desta temperatura, os resultados foram condizentes com Mota-Filho et al. (2007), visto que a caixa de isopor manteve a temperatura de 10°C com pouca variação desta, sendo registrados no decorrer de todo o experimento alterações de até 2°C para a temperatura máxima durante o período de conservação das amostras. No entanto, o mesmo dado não foi obtido na bolsa térmica, que mostrou maiores variações de temperatura, sendo a mínima atingida no estudo de 10°C, e a temperatura máxima de 15°C.

Bergstein-Galan et al. (2017) relata que a viabilidade dos espermatozoides varia conforme a temperatura em que os epidídimos são conservados, indicando que a instabilidade da temperatura nos recipientes usados neste trabalho pode ter interferido diretamente no resultado.

Os valores médios obtidos para motilidade, vigor espermático epididimários, defeitos maiores e menores e concentração de testículos direitos e esquerdos conservados em caixa de isopor com gelo, estão descritos na tabela 2:

Tabela 2 – Média dos parâmetros espermáticos encontrados das análises da amostra seminal epididimário conservadas em caixas de isopor.

Tempo de análise	T0	T4	T6	T8	T12
Motilidade	75%	60%	50%	30%	25%
Vigor	4	3	3	3	2
Defeitos maiores	10%	14%	12%	11%	10%
Defeitos menores	14%	17%	30%	26%	38%
Concentração (x 10 ⁶ ml)	67	63	67	66	65

A motilidade média do grupo controle, analisada imediatamente após a orquiectomia foi de 75%, mostrando-se superior ao resultado do experimento realizado por Ponglowhapan et al. (2006), que obteve dados de 67,8%. A divergência desses dados provavelmente está relacionada a individualidade de cada animal utilizado nos estudos, visto que apesar de hígidos, características como alimentação, manejo e ambiente de vida podem afetar a qualidade espermática desses animais (NELSON, COUTO et. al., 2010).

A individualidade dos animais também justifica a alteração presente na concentração, visto que os resultados encontrados são médias de concentrações vindas de testículos de diferentes animais, logo é esperado que exista uma divergência na concentração durante os períodos de conservação.

As análises após 6 horas apresentaram dados semelhantes ao estudo de Santos et al. (2013), onde as amostras variavam entre 44% e 60% de motilidade, assim como as análises de vigor, onde não houve perda significativa após esse tempo de conservação. Os resultados se mostraram próximos mesmo com a diferença entre as temperaturas e meios de recuperação usados, sendo que o trabalho citado manteve suas amostras próximas à 4°C, fazendo as coletas em diluidor à base de água de coco em pó (ACP 106c®).

A motilidade do grupo apresentou uma queda significativa a partir de 8 horas, tendo uma queda maior do que 50% do valor do grupo em tempo 0, diferente do estudo de Chima et

al. (2017) e Hori et al. (2004), onde as análises apresentavam motilidade superior a 65% mesmo após 48 horas de conservação em caixas de isopor a 4°C. Desta forma, as análises após 12 horas de conservação também apresentaram valores inferiores aos encontrados em outros trabalhos, como Chima et al. (2017) e Hori et al. (2004), com motilidade superior a 50%, e Ponglowhapan et al. (2006) Mota-Filho et al. (2007), que encontraram uma motilidade superior a 70%.

Em relação o vigor, a temperatura e o meio utilizado para a recuperação não apresentaram grande impacto, sendo que o mesmo se manteve com baixas alterações até 12 horas de conservação, no entanto, novamente os resultados encontrados se encontram abaixo dos resultados dos trabalhos de Pignataro (2017), que encontrou uma média de 3,8 em vigor e Uchoa et al. (2002), que obteve 4,4 de vigor em análises após 12 horas de conservação. Acredita-se que possa haver uma relação com o não alcance neste estudo de temperatura inferior relatada nas pesquisas, o que supostamente possa ter comprometido a conservação dos parâmetros espermáticos neste trabalho.

Esse resultado pode ser explicado pela incapacidade da caixa de isopor em atingir a temperatura esperada de 5°C, visto que período no qual os espermatozoides permanecem viáveis varia conforme a temperatura de armazenamento dos epidídimos (BERGSTEIN-GALAN et al., 2017), sendo a temperatura mínima atingida durante o projeto de 10° C, e a máxima de 12°C.

Outra justificativa para a discordância dos dados é o meio utilizado para recuperação dos espermatozoides, no qual já existe comprovação que os diluidores podem levar a amostra a apresentar melhor desempenho (PIGNATARO, 2017), sendo que os trabalhos citados utilizaram diluidores como tampão de citrato de sódio, Tris-gema de ovo e diluidor à base de água de coco.

No que diz respeito à morfologia espermática, dentre os defeitos maiores encontrados pode-se citar principalmente a presença de caudas fortemente dobradas. Caudas dobradas e enroladas foram as principais alterações menores encontradas. O percentual de espermatozoides normais obtido após 12 horas de conservação foi de 52%, sendo este uma amostra seminal abaixo dos padrões de acordo com o CBRA (2013) onde o sêmen fresco e o congelado devem apresentar um mínimo de 70% de células normais.

As alterações encontradas na morfologia espermática podem indicar que a amostra em algum momento durante seu processamento passou por algum estresse térmico, visto que após o período de conservação, o principal defeito encontrado foi a cauda dobrada.

Os valores médios obtidos para motilidade, vigor espermático epididimários, defeitos maiores e menores e concentração de testículos direitos e esquerdos conservados em bolsa térmica com gelo estão descritos na tabela 3:

Tabela 3 – Média dos parâmetros espermáticos encontrados das análises da amostra seminal epididimária conservadas em bolsa térmica.

Tempo de análise	T0	T4	T6	T8	T12
Motilidade	70%	50%	35%	35%	15%
Vigor	4	3	3	2	2
Defeitos Maiores	8%	10%	11%	13%	11%
Defeitos Menores	12%	16%	32%	37%	44%
Concentração (x 10 ⁶ /ml)	59	62	57	58	63

As análises de motilidade da bolsa térmica se apresentaram inferiores as análises da caixa de isopor, sendo que a média da motilidade sofreu uma redução de 50% do valor da motilidade do grupo controle já com 6 horas de conservação, e apresentou uma média de apenas 15% de motilidade com 12 horas de conservação. Diferente do que relatado posteriormente em caixas de isopor de 5 litros por Mota-Filho (2007), o estudo mostrou que as bolsas térmicas de mesmo volume não foram capazes de manter uma temperatura constante durante o período de armazenamento, revelando perdas de motilidade mais significativas

Apesar da queda progressiva da motilidade, o vigor das amostras não apresentou o mesmo declive, porém tivemos uma queda significativa a partir de 8 horas de armazenamento, enquanto na caixa de isopor essa queda se mostrou apenas após 12 horas de armazenamento.

O percentual de espermatozoides normais após 12 horas de conservação foi de 45%. Assim como nas caixas de isopor, o valor obtido não está dentro dos padrões previstos.

Os resultados obtidos para motilidade e vigor em caixas de isopor e bolsa térmica estão apresentados respectivamente nas figuras 1 e 2:

Figura 1 – Queda da motilidade de complexos testículos-epidídimos após conservação em caixa de isopor e bolsa térmica.

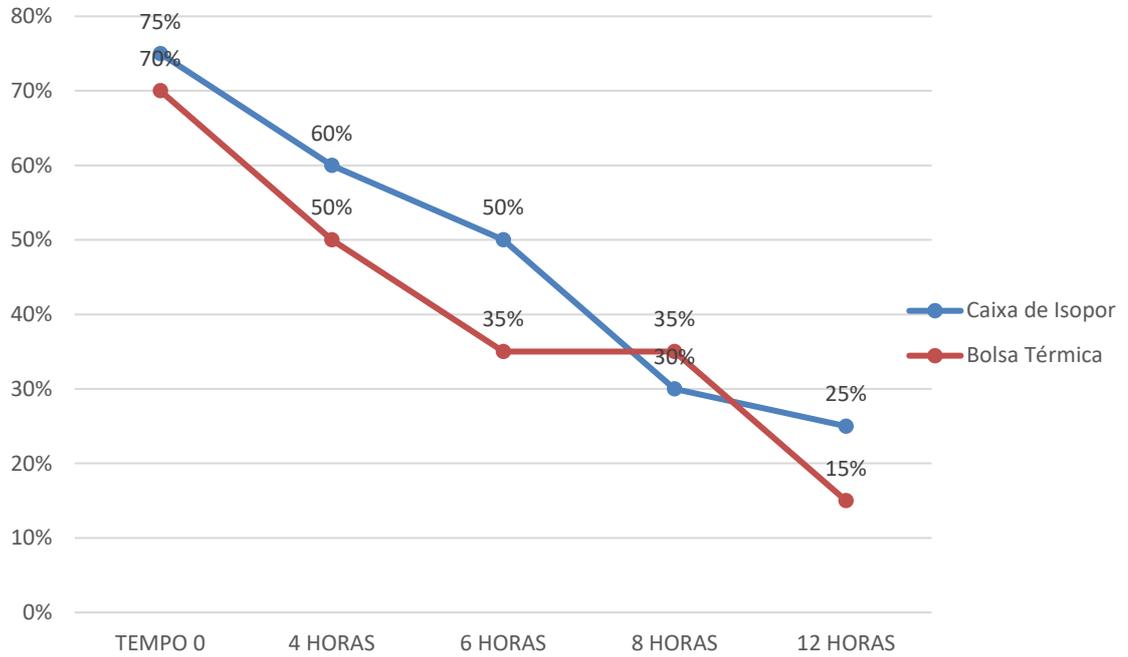
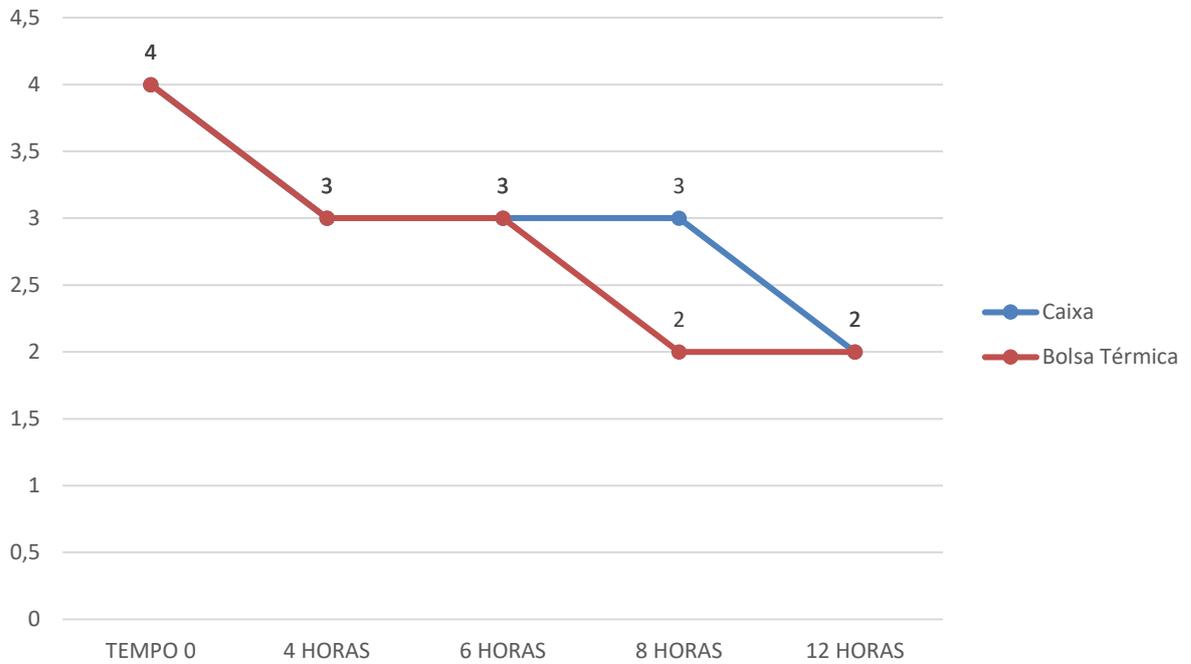


Figura 2 – Queda de vigor de complexos testículos-epidídimos após conservação em caixa de isopor e bolsa térmica.



Os valores médios obtidos para motilidade, vigor espermático epididimários, defeitos maiores e menores e concentração de testículos direitos e esquerdos conservados em temperatura ambiente estão descritos na tabela 4:

Tabela 4 – Média dos parâmetros espermáticos encontrados das análises da amostra seminal epididimária conservadas em temperatura ambiente.

Tempo de análise	T0	T2	T3	T4
Motilidade	70%	50%	15%	0%
Vigor	4	3	2	0
Anormalidades primárias	7%	9%	15%	13%
Anormalidades Secundárias	12%	20%	43%	68%
Concentração (x 10 ⁶ /ml)	61	54	58	53

As amostras não apresentaram boa viabilidade em conservação a temperatura ambiente, sendo que os espermatozoides epididimários já se apresentavam mortos após 4 horas de conservação. Esse é compatível com Kato et al. (2002) que observaram uma queda significativa da motilidade após 4 horas ao recuperarem espermatozoides da cauda do epidídimo de camundongos, porém diverge da literatura que relata a recuperação de amostras viáveis de complexo que foram mantidos em temperatura ambiente por até 5 horas, sem grandes alterações na motilidade espermática (SCHÄFER & HOLZMANN, 2000) e de Kaabi et al. (2003), que relata a viabilidade dos espermatozoides após uma conservação de 24 horas em temperatura ambiente.

A amostra destinada a temperatura ambiente apresentou porcentagem de espermatozoides normais de 42% em apenas 3 horas de armazenamento, já considerada inadequada pelo CBRA (2013).

Uchoa et al. (2002) demonstra que diluentes a base de água de coco ajudam a amostra a se manter viável durante a conservação em temperatura ambiente. Apesar de estudos demonstrarem que a solução de ringer sem lactato seja eficiente para a recuperação das células espermáticas (MARTINS et al. 2003), não há relatos sobre a eficiência dela em relação a conservação das amostras em temperatura ambiente.

5 CONCLUSÃO

A caixa de isopor revelou ser mais eficiente do que a bolsa térmica para a conservação de complexos testículos-epidídimos, e conseqüentemente da amostra de sêmen do epidídimo tendo uma menor perda em motilidade e vigor espermático. No entanto, ambas apresentaram considerável aumento em patologias, após 12 horas de armazenamento. Este fato sugere que novas metodologias e recipientes de conservação de testículos e epidídimos sejam avaliadas, para o melhor aproveitamento desta fonte de material genético.

REFERÊNCIAS

- ANGRIMANI, D. S. R.; LÚCIO, C. F.; VEIGA, G. A. L.; REGAZZI, F. M.; SILVA, L. C. G.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Biotécnicas reprodutivas com o emprego de espermatozoides epididimários em cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 37, n. 4, p.323-327, 2013.
- ARROTÉIA, K. F.; GARCIA, P. V.; BARBIERI, M. F.; JUSTINO, M. L.; PEREIRA, L. A. V. The epididymis: embryology, structure, function and its role in fertilization and infertility. In: Pereira, I.a.v. embryology - updates and highlights on classic topics. **Intech**. P. 42-66. 2012.
- BERGSTEIN-GALAN, T. C.; WEISS, R. R.; KOZICKI, L. E; BICUDO, S. D. Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, Belo Horizonte, v. 41, n. 3, p.659-664, set. 2017.
- BLOM E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. In: Symposium Internationale de Zootechnie, 7, 1972, Milano, Italy. **Proceedings...** Milano: SIZ, 1972.
- 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, p. 11-16, 2013
- CHIMA, U.M.; ABU, A.H.; DAWUDA, P.M.; KISANI, A.I.; AHEMEN, T. Effect of Storage Time on Cauda Epididymal Sperm Parameters of Nigerian Local Dogs. **Open Journal of Veterinary Medicine**, n. 7, p. 151-161. 2017
- COUROT, M.; HOCHEREAU-DE-REVIERS, M. T.; ORTAVANT, R. Spermatogenesis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). The testis. **New York: Academic Press**, v. 1, cap. 6, p. 339-432. 1970
- FOOTE, R. H.; SWIERSTRA, E. E.; HUNT, W. L. Spermatogenesis in the dog. **Anat. Rec.**, v. 173, p. 341-352, 1972.
- FOSSUM, T.W. **Cirurgia de pequenos animais**, 2. Ed. São Paulo: Elsevier, Cap.28, p. 619, 2005.
- GARCÍA-ALVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; GARDE, J. J.; RAMÓN, M.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R.; ESTESO, M.C.; PÉREZ-GUZMÁN, M. D.; SOLER, A. J. Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and post-mortem collection. **Theriogenology**, v.72, n.2, p.160-168, 2009

GARDE, J.; AGUADO M.; PÉREZ S.; GARRIDO D.; PÉREZ-GUZMÁN M.; MONTORO V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. **Theriogenology**. V. 41, N. 1, p. 203. 1994.

HORI, T.; HAGIUDA, K.; ENDO, S.; HAYAMA, A.; KAWAKAMI, E.; TSUITSUI, T. Unilateral Intrauterine Insemination with Cryopreserved Caudal Epididymal Sperm Recovered from Refrigerated Canine Epididymides. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 67, p. 1141-1147. 2004

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.

JIMÉNEZ, E.; PÉREZ-MARÍN, C. C.; MILLÁN, Y.; AGÜERA, E. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. **Animal Reproductin Science**. n. 123, p. 265-269. 2011.

KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered postmortem. **Theriogenology**. v. 60, p. 1249-1259. 2003.

KATO, M.; MAKINO, S.; KIMURA, H.; OTA, T.; FURUHASHI, T.; NAGAMURA, Y.; HIRANO, K. *In vitro* evaluation of acrossomal status and motility in rat epididymal spermatozoa treated with chlorohydrin for predicting their fertilizing capacity. **Journal of Reproduction and Development**. V. 48, p. 461-468. 2002.

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

KISHIKAWA, H.; TATENO, H.; YANAGIMACHI, R. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4 C. **Reproduction**, [s.l.], v. 116, n. 2, p.217-222, 1 Jul. 1999.

MARADÁS, 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, n. 3, p.69-74, 2006.

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**. 116:50-57. 2009.

MARTINS, M.I.M.; SOUZA, F.F.; CHIRINÉA, V.H.; TEBET, J.M.; LOPES, M.D. Viabilidade de espermatozoides criopreservados, obtidos do epidídimo de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. V. 27, p. 367-368. 2003.

MOTA FILHO, A. C.; THIBÉRIO SOUZA CASTELO, T. Z.; COSTA, L. L. M.; LIMA, G. L.; SILVA, A. R. CONSERVAÇÃO DO SÊMEN CANINO SOB REFRIGERAÇÃO

EM DIFERENTES CAIXAS ISOTÉRMICAS. **Acta Veterinaria Brasilica**, Mossoro, v. 1, N. 3, p.78-83, 2007

NICHI, M.; RIJSSELAERE, T.; LOSANO, J. D. A.; ANGRIMANI D. S. R.; KAWAI G. K. V.; GOOVAERTS, I. G. F.; VAN SOOM, A.; BARNABE, V. H.; DE CLERCQ, J. B. P.; BOLS, P. E. J. Evaluation of epididymis storage temperature and cryopreservation conditions for improved mitochondrial membrane potential, membrane integrity, sperm motility and *in vitro* fertilization in bovine epididymal sperm. **Reprod. Domest. Anim.**, v.52, n.2, p. 257-263, 2016.

NAGAO, J. F., MARTINS, M. I. M., PADILHA, L. C.; SAVI, P. A. P. Características morfofuncionais de espermatozoides caninos mantidos em “containers” para transporte refrigerado de sêmen, utilizando o diluente “Botu-Sêmen®”. **In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 17, 2007, Anais... Curitiba: CBRA, p.186, 2007.

NELSON, R.W.; COUTO, C.G. **Medicina interna de pequenos animais**. Parte 8, cap. 60, p.950-957. 4ªed. Elsevier, 2010.

OLIVA, S. U.; RINALDO, P. A.; STUMPP T. Biologia epididimária: Maturação espermática e expressão gênica. **O Mundo da Saúde**. 33:419-425. 2009.

ORSI, A. M. Regional histology of the epididymis of the dog. A light microscope study. **Anatomischer Anzeiger**. 153:441-445. 1983.

PAPA, F. O.; MELO, C. M.; FIORATTI, E. G.; DELL’AQUA, JR. J. A.; ZAHN, F. S.; ALVARENGA, M. A. Freezing of stallion epididymal sperm. **Animal Reproduction Science**. 107:293-3012008.

PARVINEN, M. et al. In vitro stimulation of stage-specific deoxyribonucleic acid synthesis in rat seminiferous tubule by interleukin-1alfa. **Endocrinology**, v. 129, p. 1614-1620, 1991.

PEÑA AI. **Supervivencia y fertilidad del semen canino sometido a congelacion descongelação**. 329p. Tese (Doutorado) - Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Espanha, 1997

PIGNATARO, Tatiana Almeida. **Refrigeração do sêmen canino com diferentes diluentes e temperaturas de armazenamento**. 23 f. TCC (Graduação) - Curso de Medicina Veterinária, Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

PINTO, C. R. F.; PACCAMONTI, D.L.; EILTS, B.E. Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen. **Theriogenology**, v. 52, p. 609-616, 1999.

PONGLOWHAPAN, S.; CHATDARONG, K.; SIRIVAIDYAPONG, S.; LOHACHIT, C. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. **Theriogenology**. v.66, p.1633-1636. 2006.

PONGLOWHAPAN, S.; ESSÉN-GUSTAVSSON, B.; LINDE-FORSBERG, C. Influence of glucose and fructose in the extender during long-term storage of chilled canine semen. **Theriogenology**, v.62, p.1498-1517, 2004

RUSSELL, L. D. et al. Histological and histopathological evaluation of the testis. **Cache River Press**, Clearwater, Florida, 1990.

RUSSELL, L. D.; GRISWOLD, M. D. (Ed) **The Sertoli cell**. Cache River Press Clearwater, Florida.1993.

SANTOS, J. F. P.; RODRIGUES, E. E. M.; SILVA, K. B. P.; FREITAS, P. C.; NETO, J. M. L. ; CARDOSO, R. C. S. **Recuperação de espermatozoides epididimários caninos a 4°C com um diluidor à base de água de coco em pó (ACP-106c®)**. XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX 2013, 3p. Recife. 2013.

SAVI, P. A. P.; MOTHEO, T. F.; PADILHA-NAKAGHI, L. C.; PIRES-BUTTLER, E.; VICENTE, W. R. R. Técnica Modificada de Compressão do Ducto Deferente e Cauda do Epidídimo para Obtenção de Espermatozoides Caninos. **Investigação**, v. 14, p. 18-22, 2015.

SCHÄFER, S.; HOLZMANN, A. The use of transmigration and Spermac® stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. **Animal Reproduction Science**. V. 59, p. 201-211. 2000.

SILVA, A. R.; SATZINGER, S.; LEITE, L. G.; SILVA, L. D. M. Gestação obtida por inseminação artificial com sêmen canino refrigerado transportado à distância – relato de caso. **Clínica Veterinária**. 50: 56-66. 2004.

SOUZA, F. F. **Caracterização eletroforética do perfil proteico e análise bioquímica do plasma seminal canino**. 98p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 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, n.1-2, p.76-82, 2011.

TSUTSUI, T.; WADA, M.; ANZAI, M.; HORI, T. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. **Journal of veterinary medical science**. 65:397-399. 2003.

UCHOA, D. C.; SILVA, A.R.; CARDOSO, R. C. S.; PEREIRA, B. S.; SILVA, D. M. conservação do sêmen canino a 37oc em diluentes à base de água de coco. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.32, n.1, p.91-95, 2002.

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