



Cinética de espermatozoides criopreservados de cães obtidos por técnicas de recuperação epididimária

Kinetics of cryopreserved dog spermatozoa obtained by epididymal recovering techniques

Luanna Soares de Melo Evangelista^{1*}, Sabrina Thabla Pereira Lopes², Marcos Antônio Celestino de Sousa Filho², Jefferson Hallisson Lustosa da Silva², Filipe Nunes Barros², Marlon de Araújo Castelo Branco³, José Adalmir Torres de Souza⁴

Departamento de Parasitologia e Microbiologia¹, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, PI, Brasil; Pós-graduandos em Ciência Animal², UFPI, Teresina, PI, Brasil; Centro Universitário Maurício de Nassau³ – UNINASSAU, Teresina, PI, Brasil; Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária⁴, Centro de Ciências Agrárias, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

Resumo

Técnicas de coleta de espermatozoides epididimários são utilizadas em diversas espécies animais, sendo ferramentas de biotecnologias importantes aplicadas em casos de animais que precisam ser castrados ou que vieram a óbito. O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de espermatozoides criopreservados de cães obtidos por meio de técnicas de recuperação epididimária. Foram coletados 30 complexos testículo-epidídimos (CTE) de cães saudáveis, sendo que cada CTE de determinado animal foi destinado para cada técnica utilizada, 15 direcionados para a técnica de recuperação de espermatozoides epididimários por fluxo retrógrado (FR) e 15 por flutuação (FL). Os CTE foram acondicionados em sacos plásticos identificados, contendo solução salina e levados ao Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal da Universidade Federal do Piauí (LBRA/UFPI) para a realização da diluição e criopreservação espermática após a recuperação epididimária. A congelamento foi realizada por meio de uma rampa manual, com as amostras refrigeradas a 5 °C, mantidas em vapor de nitrogênio por 5 minutos e, posteriormente, colocadas no botijão. A análise computadorizada do sêmen (CASA) nas amostras descongeladas foi realizada na Universidade Estadual do Ceará (UECE), sendo avaliados dez parâmetros seminais. Foi empregada a análise de variância, aplicando o teste de Tukey. Nessas amostras, houve diferença significativa quanto à motilidade progressiva entre as técnicas testadas e a motilidade total apresentou valores superiores a 30%, não havendo influência das técnicas nos demais parâmetros seminais. Conclui-se que a cinética de espermatozoides de cães obtidos por recuperação epididimária avaliados pelo CASA apresentou resultados satisfatórios após a criopreservação.

Palavras-chave: canino, CASA, epidídimo, motilidade espermática.

Abstract

Epididymal sperm collection techniques are used in several animal species and are important biotechnology tools applied to animals that needed to be castrated or that died. The objective of this study was to evaluate the kinetics of cryopreserved dog sperm obtained by epididymal recovery techniques. Thirty testicular-epididymal complexes (CTE) were collected from healthy dogs, with each CTE of a given animal being assigned to each technique used, 15 of them directed to the retrograde flow epididymal sperm recovery technique and 15 by fluctuation technique. The CTE were placed in identified plastic bags, containing saline solution and taken to the Animal Reproduction Biotechnology Laboratory of the Federal University of Piauí (LBRA/UFPI) for sperm dilution and cryopreservation after epididymal recovery. The freezing was carried out using a manual ramp, with the samples refrigerated at 5 °C, maintained in nitrogen vapor exposition five minutes and, later, placed in the container. Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) was performed in the thawed samples at the State University of Ceará (UECE) and ten seminal parameters were evaluated. Analysis of variance was applied by the Tukey test. In thawed samples, there was a significant difference in progressive motility between the tested techniques and total motility presented values greater than 30%, with no influence of the recovery technique on remaining parameters. It was concluded that the sperm kinetics of dogs obtained by epididymal recovery evaluated by CASA presented satisfactory results after cryopreservation.

Keywords: canine, CASA, epididymis, sperm motility.

¹Correspondência: luannaufpi@gmail.com

Recebido: 03 de setembro de 2019

Aceito: 06 de abril de 2020



Introdução

Espermatozoides epididimários são coletados e utilizados experimentalmente em diversas espécies animais (Granemann, 2006; Mota Filho et al., 2013; Lima et al., 2016), sendo uma importante ferramenta de biotecnologia aplicada em casos de animais de alto valor genético ou de grande estima, que precisam ser castrados ou que vêm a óbito.

Algumas técnicas são utilizadas possibilitando a recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo do animal e podem ser uma oportunidade para assegurar a preservação do material genético (Mota Filho e Silva, 2012). Esses gametas, assim que recuperados e diluídos, são capazes de resistir à refrigeração e à criopreservação (Martins et al., 2007).

Duas técnicas são preferencialmente utilizadas para a obtenção de espermatozoides epididimários: flutuação e fluxo retrógrado. A primeira consiste em fatiar a cauda do epidídimo e deixá-lo em um meio diluidor para que os espermatozoides migrem para esse meio, enquanto que a outra promove um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo aplicando-se pressão aos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (Yu e Leibo, 2002; Mota Filho et al., 2014).

A gema de ovo é comumente utilizada nos diluidores seminais aplicados à reprodução canina, tendo a função de proteger as células espermáticas durante as etapas de congelação e descongelação, com ação principal sobre a membrana plasmática dos espermatozoides. Além disso, sua utilização juntamente com crioprotetores associados, constitui a melhor alternativa para a criopreservação do sêmen canino (Rizzoto et al., 2014).

A criopreservação de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de animais pode provocar mais danos nas células espermáticas que na congelação de espermatozoides colhidos pelas técnicas convencionais, principalmente com relação à resistência espermática ao choque térmico e ao estresse osmótico (Álvarez et al., 2012), com isso, é necessário que as concentrações de diluidores e crioprotetores sejam muito bem preparadas e os métodos utilizados para avaliação seminal pós-criopreservação sejam bastante eficazes.

A literatura mostra que diversos sistemas de análises computadorizadas do sêmen como o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA) têm sido propostos e aplicados na tentativa de minimizar os obstáculos da avaliação subjetiva seminal, além de favorecer o conhecimento de mais dados para o estudo da reprodução humana e animal (Matos et al., 2008).

Dessa forma, esse trabalho objetivou avaliar a cinética de espermatozoides criopreservados de cães obtidos por meio de técnicas de recuperação epididimária.

Material e Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI) sob o número de protocolo 304/17. O experimento foi realizado de julho a dezembro de 2017, no município de Teresina, Piauí.

Os critérios de inclusão para a avaliação da sanidade dos animais utilizados neste experimento foram estabelecidos por meio de exames andrológicos preconizados pelo CBRA (2013), além da realização de hemograma e bioquímica sérica, com resultados dentro dos parâmetros de normalidade para cães e sorologia negativa para leishmaniose visceral e brucelose.

Neste trabalho, foram utilizados trinta complexos testículo-epidídimos (CTE) de cães machos, saudáveis, sexualmente maduros, com idade entre 2 a 8 anos de idade, pesando entre cinco a quinze quilogramas (kg), a maioria sem raça definida (SRD), sendo que cada CTE de determinado animal foi destinado para cada técnica utilizada, quinze CTE destes animais direcionados para a técnica de recuperação de espermatozoides epididimários por fluxo retrógrado (FR) e quinze por flutuação (FL).

A coleta dos CTE foi realizada após a orquiectomia dos cães provenientes de cirurgias eletivas realizadas no Hospital Veterinário (HVU/UFPI) e em quatro clínicas veterinárias particulares do município de Teresina, Piauí. O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos estéreis, previamente identificados, contendo solução salina (NaCl 0,9%), sendo transportados em caixas isotérmicas com temperatura média de 30 °C, por um tempo de 30 minutos até o Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA/UFPI), para posterior realização do procedimento das técnicas, conforme metodologias seguidas por Yu e Leibo (2002) e Mota Filho et al. (2014). O tempo máximo para a realização das técnicas e o processo de refrigeração foi de até 2 horas após a chegada do material no laboratório.

Na técnica de flutuação, os epidídimos e os ductos deferentes foram dissecados até o isolamento



completo da cauda do epidídimo e do ducto, estes foram posicionados sobre uma placa de Petri de 90x15mm de diâmetro e fatiados em cortes seriados, adicionados de 3 mL do diluidor tris-gema aquecido a 37 °C (mesma temperatura que estavam mantidos os CTE), assim permanecendo por 10 minutos. O diluidor tris-frutose-ácido cítrico foi produzido no LBRA/UFPI, contendo 20% de gema de ovo e 6% glicerol, com pH 7,0 e osmolaridade 316 mOsm/mL.

Na técnica de fluxo retrógrado, após a dissecação do epidídimo, foi aplicada uma pressão nos vasos deferentes por meio de uma lâmina de vidro até que o conteúdo seminal da cauda do epidídimo saísse por meio de um corte realizado na junção com o corpo do epidídimo, sendo também colocado em placa de Petri, onde foram adicionados o mesmo diluidor e a mesma quantidade supracitados.

O volume do sêmen recuperado foi diluído em alíquotas iguais de 3mL para cada técnica, sendo mensuradas em tubo de coleta do tipo Falcon de 15 mL. Em seguida, foram avaliados os parâmetros de motilidade total (0-100%) e vigor espermático (1-5) (CBRA, 2013). Os tubos Falcon com o sêmen diluído foram submetidos ao processo de refrigeração em geladeira comum, onde foram colocados dentro de recipientes com água e monitorados até atingirem a temperatura de 5 °C, sendo estabilizados por meia hora nessa temperatura. Posteriormente, as amostras seminais foram envasadas em palhetas de 0,5 mL, previamente identificadas e submetidas à rampa de congelamento, onde foram posicionadas horizontalmente a 5 cm acima do nível de nitrogênio líquido, mantidas por cinco minutos e, em seguida, colocadas em botijão para criopreservação a -196 °C.

A análise computadorizada do sêmen foi realizada no Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade Estadual do Ceará (UECE), por meio do sistema CASA em software específico (*Sperm Class Analyser*®, versão 5.2.0, Microptic S.L., Barcelona, Espanha). Para a descongelamento das amostras, as palhetas foram imersas em banho-Maria a uma temperatura de 37 °C durante um minuto, conforme o protocolo proposto por Silva et al. (2006) e Moura et al. (2013).

A técnica do CASA consistiu na utilização de uma alíquota de 10 µL de cada amostra pós-descongelamento, colocada em uma câmara de Makler, previamente aquecida a 37 °C, deixada em repouso por 1 minuto nessa temperatura e analisada com auxílio de um microscópio de contraste de fase com iluminação estroboscópica, acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema. Para cada amostra foram analisados até quatro campos. Dentre os parâmetros avaliados foram registrados: Motilidade total (MOT - %); Motilidade progressiva (MOP - %); Velocidade curvilínea (VCL - µm/s); Velocidade em linha reta (VSL - µm/s); Velocidade média do percurso (VAP - µm/s); Linearidade (LIN - %); Retilinearidade (STR - %); Índice de oscilação ou Wobble (WOB), Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF - Hz) e Amplitude (ALH - µm), todos de forma individual para cada espermatozoide analisado.

Para a análise estatística dos dados foram obtidas médias e desvio-padrão das amostras de recuperação de espermatozoides epididimários, utilizando a Análise de Variância, Programa Statistical Analysis System for Windows (SAS) e empregando o teste de Tukey no caso de diferenças significativas entre as técnicas testadas e os parâmetros seminais avaliados. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Neste trabalho, observou-se que tanto a técnica de FR como a de FL tiveram resultados satisfatórios, podendo ser utilizadas para a recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo de cães após a orquiectomia.

A literatura relata que a coleta de espermatozoides da cauda do epidídimo através da técnica de fluxo retrógrado é a mais indicada, pois as amostras obtidas apresentam um menor nível de contaminação e apresentam melhor qualidade em relação aos outros métodos (Martinez-Pastor et al., 2006; Mota Filho et al., 2014; Restrepo et al., 2017), porém, neste estudo não houve diferença significativa entre as técnicas avaliadas quanto aos parâmetros de motilidade total e vigor espermático tanto para o sêmen fresco diluído como para o pós-criopreservado (Tab. 1).

Uma boa qualidade espermática epididimária pode ser avaliada por meio da motilidade total dos espermatozoides recém-recuperados. Estudos mostraram que por meio da técnica de flutuação, os espermatozoides tiveram MOT de 65% (Yu e Leibo, 2002) e pela técnica de fluxo retrógrado a MOT apresentou resultados diversos, 53% (Restrepo et al., 2017), 68% (Mota Filho et al., 2014) e 77% (Ponglowhapan e Chatdarong, 2008). Por meio de uma técnica de FR modificada, a MOT espermática apresentou 81% (Pennacchisavi et al., 2015), resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho.

O parâmetro da motilidade total reflete a porcentagem de células espermáticas móveis e a qualidade do movimento dessas células numa determinada amostra (Silva et al., 2003), indicando, neste



Tabela 1. Motilidade total e vigor de espermatozoides epididimários de cães orquiectomizados, obtidos por duas técnicas de recuperação espermática, em sêmen fresco diluído e pós-criopreservado ($\chi \pm \text{EMP}$).

Técnicas	Parâmetros			
	Sêmen Fresco Diluído		Sêmen Pós-Criopreservado	
	Motilidade	Vigor	Motilidade	Vigor
FL	79,6 \pm 8,9a	3,2 \pm 0,3a	30 \pm 8,6a	2,7 \pm 0,4a
FR	82,3 \pm 7,7a	3,4 \pm 0,3a	34 \pm 9,8a	2,8 \pm 0,5a

Letras iguais na mesma coluna não indicam diferença estatística nos parâmetros seminais entre as técnicas testadas ($p < 0,05$).

resultado, uma boa viabilidade dos espermatozoides assim que foram recuperados dos epidídimos dos cães, porém, é importante lembrar que essa viabilidade espermática pode diminuir conforme aumenta o tempo da retirada dos epidídimos e da recuperação dos espermatozoides da cauda desse órgão, além da temperatura que os epidídimos devem ser mantidos da coleta até a refrigeração e criopreservação seminal (Bergstein-Galan et al., 2017).

Vários fatores podem comprometer a qualidade seminal tanto antes como após a criopreservação, como a técnica utilizada para a recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo; o tempo entre a recuperação desses espermatozoides, a refrigeração e a congelação; e até o diluidor e o crioprotetor utilizados em todo o processo (Hori et al., 2015). Vale ressaltar que o tempo máximo da coleta dos CTE dos animais deste trabalho até o início dos procedimentos das técnicas de recuperação espermática girava em torno de 1 hora, sendo 30 minutos de transporte do local da coleta até o laboratório e mais 30 minutos de preparo do material e o tempo total para a realização das técnicas e o processo de refrigeração girava em torno de 2 horas.

Com relação ao CASA, houve diferença significativa no parâmetro seminal de motilidade progressiva (MOP) entre as técnicas testadas nesse trabalho, enquanto a MOT apresentou valores similares para as duas técnicas de colheita de espermatozoides epididimários avaliadas (Tab. 2).

Para os parâmetros de MOT, MOP, VCL, VSL, VAP, LIN e STR quanto maior o valor numérico obtido das amostras, melhor é a qualidade espermática, e, para o ALH é o oposto (Arruda, 2000).

Neste resultado, a MOT espermática pós-criopreservação apresentou valores superiores a 30% nas duas técnicas testadas, com dados semelhantes observados na literatura (Ponglowhapan e Chatdarong, 2008), porém outros estudos encontraram esse parâmetro com valores de 50% (Mota Filho et al., 2014) e 54% (Martins et al., 2012), utilizando o mesmo diluidor. Um trabalho recente utilizando o diluidor comercial Triladyl (Minitube[®]) suplementado de gema de ovo a 10% e 20%, centrifugada, apresentou MOT abaixo de 30% e mesmo com esse valor inferior, os autores concluíram que os resultados foram satisfatórios (Restrepo et al., 2017).

Porcentagens superiores a 30% de MOT de espermatozoides pós-criopreservados provenientes da coleta por manipulação digital ou eletroejaculação são consideradas aceitáveis para uso, segundo o CBRA (2013), já para espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo não há informação precisa na literatura quanto a esse parâmetro após o processo da criopreservação. O que se sabe é que as células espermáticas recuperadas da cauda do epidídimo podem sofrer mais danos após a criopreservação quando comparadas com aquelas amostras provenientes das técnicas convencionais (Álvarez et al., 2012) e essa baixa resistência ao choque térmico pode ser justificada devido às diferenças funcionais e morfológicas entre os espermatozoides do ejaculado e os recuperados da cauda do epidídimo, principalmente porque estes últimos não são expostos ao fluido prostático (Luvoni e Morselli, 2016).

Álvarez et al. (2012) também afirmaram que uma maior concentração do crioprotetor glicerol, no caso 8%, possibilitou uma maior proteção às células espermáticas recuperadas de epidídimos de ovinos durante a criopreservação. Normalmente, nos trabalhos de criopreservação de espermatozoides epididimários de cães, a concentração de glicerol utilizada é de 6% (Moura et al., 2013; Santos et al., 2013; Mota et al., 2014). Outra alternativa mostrada em alguns trabalhos foi a utilização de fluido prostático em amostras espermáticas epididimárias caninas com a finalidade de melhorar a cinética espermática (Korochkina et al., 2014), com o objetivo sendo alcançado nos resultados encontrados por esses autores.

A motilidade espermática é comumente apontada como uma das mais importantes características associadas a habilidade fertilizante do espermatozóide (Cox et al., 2006). Na maioria dos resultados de recuperação espermática da cauda do epidídimo de animais, a MOP é o parâmetro mais sensível relacionado ao tempo e à temperatura de preservação (Mota Filho et al., 2014). A porcentagem de espermatozoides com movimentos rápidos e lineares diminui consideravelmente quando avaliados após a



Tabela 2. Cinética de espermatozoides epididimários de cães orquiectomizados, avaliados pelo CASA pós-criopreservação ($\bar{x} \pm \text{EMP}$).

Técnicas	MOT	MOP	VCL	VSL	VAP	LIN	STR	WOB	BCF	ALH
FL	30 \pm 8,6a	22,6 \pm 2,2a	50,6 \pm 10a	33,6 \pm 7,1a	40,2 \pm 6,4a	57,4 \pm 13,1a	78,5 \pm 8,5a	60,7 \pm 11,3a	6,5 \pm 5,2a	2,2 \pm 1,7a
FR	34 \pm 9,8a	28,3 \pm 2,2b	53,2 \pm 11a	34,2 \pm 5,2a	40,5 \pm 5,4a	57,8 \pm 8,2a	78,4 \pm 5,5a	58,4 \pm 7,2a	6,9 \pm 3,9a	2,1 \pm 1,1a

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística nos parâmetros seminais entre as técnicas testadas e Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os parâmetros seminais dentro de cada técnica ($p < 0,05$).



refrigeração e a congelamento (Bergstein-Galan et al., 2017), portanto, quanto menos estresse térmico essas células espermáticas passarem, durante e após a criopreservação, menos danos serão provocados às mesmas (Moura et al., 2013).

A MOP funciona como células móveis que se movimentam de forma progressiva num total de espermatozoides de uma amostra (Arruda, 2000), sendo um parâmetro muito importante de ser avaliado na fertilização. Os valores da MOP encontrados neste trabalho foram superiores aos resultados relatados por Hewitt et al. (2001), Mota Filho et al. (2014) e Restrepo et al. (2017) e um pouco inferiores aos de Martins et al. (2012) e Korochkina et al. (2014).

Além da MOP, sabe-se que existe uma relação entre os valores aumentados de VCL, VSL e VAP e a capacidade de fertilização do sêmen canino (Silva et al., 2006), estes parâmetros foram semelhantes aos relatados por Korochkina et al. (2014) quando estes autores utilizaram o diluidor tris-gema no processo de refrigeração-congelamento. A literatura cita, ainda, que o parâmetro seminal STR (78% nas duas técnicas avaliadas) também está associado à fertilidade em algumas espécies de animais, porém o limiar no qual esse parâmetro pode influenciar sobre a fertilidade na espécie canina ainda é desconhecido (Mota Filho et al., 2014).

Baseado nos parâmetros seminais avaliados tanto antes como após a criopreservação, pode-se afirmar que os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo dos cães deste trabalho apresentavam uma boa motilidade e trabalhos futuros podem ser realizados com o intuito de verificar essa eficácia *in vivo*.

Conclusão

Conclui-se que a cinética de espermatozoides de cães obtidos por recuperação epididimária avaliados por meio do CASA apresentou resultados satisfatórios após a criopreservação.

Agradecimentos

Ao Núcleo Integrado de Biotecnologia da UECE em nome do Professor Dr. José Ferreira Nunes por autorizar o uso do aparelho CASA para a realização deste trabalho.

Referências

- Álvarez M, Tamayo-Canul J, Martínez-Rodríguez C, López-Urueña E, Gomes-Alves S, Anel L, Martínez-Pastor F, de Paz P. Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Anim Reprod Sci*, v.132, n.3-4, p.145-154, 2012.
- Arruda RP. Avaliação dos efeitos de diluidores e crioprotetores para o espermatozoide equino pelo uso de microscopia de epifluorescência, citometria de fluxo, análises computadorizadas da motilidade (CASA) e da morfometria (ASMA). 121f. Tese (Livro Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.
- Bergstein-Galan TG, Weiss RR, Kozicki LE, Bicudo SD. Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação. *Rev Bras Reprod Anim*, v.41, n.3, p.659-664, 2017.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3ª ed., Belo Horizonte, 2013.
- Cox JF, Alfaro V, Montenegro V, Rodriguez-Martinez H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. *Theriogenology*, v.66, n.4, p.860-867, 2006.
- Granemann LC, Weiss RR, Kozicki LE, Muradas PR, Tremel TE. Número total de espermatozoides de garanhões obtidos através da colheita com vagina artificial e por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo. *Arch Vet Sci*, v.11, n.1, p.73-77, 2006.
- Hewitt DA, Leahy R, Sheldon IM, England GCW. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Anim Reprod Sci*, v.67, p.101-111, 2001.
- 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. *J Vet Med Sci*, v.77, n.5, p.625-630, 2015.
- Korochkina E, Johannisson A, Lavanya G, Morrell JM, Axner E. Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozen-thawed canine epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v.82, p.1206-1211, 2014.
- Lima DBC, Silva TFP, Aquino Cortez A, Pinto JN, Magalhães FF, Caldini BN, Silva LDM.



- Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.68, n.4, p.873-881, 2016.
- Luvoni GC, Morselli MG.** Canine epididymal spermatozoa: A hidden treasure with great potential. *Reprod Domest Anim*, v.52, p.197-201, Suppl 2, 2016.
- Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraes P, De Paz P, Anel L.** Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, v.65, n.3, p.471-485, 2006.
- Martins CF, Rumpf, R, Pereira DC, Dode MN.** Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Anim Reprod Sci*, v.101, n.3-4, p.326-331, 2007.
- Martins MIM, Justino RC, Sant'Anna MC, Trautwein LGC, Souza FF.** Comparison of two different extenders for cryopreservation of epididymal dog sperm. *Reprod Domest Anim*, v.47, n.6, p.293-294, 2012.
- Matos DL, Araújo AA, Roberto IG, Toniolli R.** Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. *Rev Bras Reprod Anim*, v.32, n.3, p.225-232, 2008.
- Mota Filho AC, Silva LDM.** Recuperação e conservação de espermatozoides epididimários de mamíferos. *Acta Vet Bras*, v.6, n.1, p.1-8, 2012.
- Mota Filho AC, Silva HVR, Freitas LA, Nunes TGP, Araújo AA, Silva LDM.** Refrigeração do epidídimo canino a 4 °C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. *Pesq Vet Bras*, v.33, n.9, p.1155-1160, 2013.
- Mota Filho AC, Silva HVR, Nunes TGP, Souza MB, Freitas LA, Araújo AA, Silva LDM.** Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS. *Cryobiology*, v.69, p.17-21, 2014.
- Moura CS, Nunes AKS, Silva BS, Peixoto CA, Silva AR, Silva SV, Guerra MMP.** Efeito da temperatura de descongelamento na integridade de espermatozoides criopreservados de cães. *Arq Bras Med Vet Zoo*, v.65, n.4, p.1057-1064, 2013.
- Pennacchisavi PA, Motheo TF, Nakaghi LCP, Buttler EP, Vicente WRR.** Técnica modificada de compressão do ducto deferente e cauda do epidídimo para obtenção de espermatozoides caninos. *Investigação*, v.14, n.1, p.1-7, 2015.
- Ponglowhapan S, Chatdarong K.** Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology*, v. 69, n. 6, p.666-672, 2008.
- Restrepo BG, Madrid RCA, Prieto RL, Duque CJE, Usuga SA.** Congelación de semen epididimal canino con yema de huevo centrifugada. *Rev Investig Vet Perú*, v.28, n.4, p.876-885, 2017.
- Rizzoto G, Moreira F, Varela Junior AS, Dode MEB, Nobre MO, Corcini CD.** Efeitos da adição de glicerol e etilenoglicol associados sobre parâmetros de viabilidade espermática na criopreservação de sêmen canino. *PUBVET*, v.8, n.22, p.2675-2805, 2014.
- Santos JAG, Rosas JCT, Camarillo CO, Olivares AT, Onofre MV, Rodríguez AA.** Criopreservación de espermatozoides epididimales a diferentes tempos postmortem em caninos. *Rev Salud Anim*, v.35, n.2, p.137-141, 2013.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Principais aspectos ligados à aplicação da inseminação artificial na espécie canina. *Rev Port Cienc Vet*, v.98, n.546, p.53-60, 2003.
- Silva AR, Cardoso RCS, Silva LDM.** Influence of temperature during glycerol addition and post-thaw dilution on the quality of canine frozen semen. *Reprod Domest Anim*, v.41, p.74-78, 2006.
- Yu I, Leibo SP.** Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. *Theriogenology*, v.57, n.3, p.1179-1190, 2002.
-