



Recuperação, caracterização e criopreservação de espermatozoides epididimários de animais silvestres do bioma Caatinga

Recovery, characterization and cryopreservation of epididymal sperm from wild animals of the Caatinga biome

Andreia Maria da Silva^{1*}, Romário Parente dos Santos¹, Yuri Gonçalves Matos¹, Alexandre Rodrigues Silva¹

¹Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal, UFERSA, Mossoró, RN, Brasil

Resumo

A Caatinga, bioma exclusivamente brasileiro, abriga grande diversidade biológica, porém sofre com graves ameaças ambientais. Por isso, é iminente a necessidade de desenvolvimento de técnicas voltadas para a conservação dos animais que nela habitam, bem como se seu germoplasma. Quando do súbito óbito de um animal biologicamente valioso, a recuperação de espermatozoides epididimários pode se apresentar como a única possibilidade para salvaguardar gametas. Ainda, esta biotécnica configura-se em uma ferramenta possível de ser utilizada quando não há outra forma de se coletar o sêmen em determinada espécie. Os espermatozoides coletados podem ser armazenados por meio da criopreservação, e posteriormente utilizados em outras biotecnologias. Neste sentido, esta revisão tem como objetivo apresentar os aspectos da recuperação, caracterização e criopreservação de espermatozoides epididimários em animais silvestres com principal foco em espécies do bioma Caatinga, como os preás, cutias, catetos e emas.

Palavras-chave: conservação *in vitro*, sustentabilidade ambiental, biobanco.

Abstract

The Caatinga, an exclusively Brazilian biome, is home to great biological diversity, but suffers from serious environmental threats. Therefore, there is an imminent need to develop techniques aimed at the conservation of the animals that inhabit it, as well as their germplasm. When the sudden death of a biologically valuable animal, the recovery of epididymal spermatozoa may present itself as the only possibility to safeguard gametes. Still, this biotechnique is a tool that can be used when there is no other way to collect semen in each species. Collected spermatozoa can be stored through cryopreservation, and later used in other biotechnologies. In this sense, this review aims to present aspects of recovery, characterization, and cryopreservation of epididymal spermatozoa in wild animals with a focus on species from the Caatinga biome, such as cavies, agoutis, collared peccary, and rheas.

Keywords: *in vitro* conservation, environmental sustainability, biobank.

Introdução

A Caatinga é um bioma presente apenas no Brasil, ocupando 11% do território nacional, e apresentando uma vasta biodiversidade (Brasil, 2023). No entanto devido a crescente ameaça ao bioma, com a desertificação, mudanças climáticas, agropecuária extensiva e diversas formas de agressão e degradação (Tabarelli et al., 2018), fazem-se necessários mais estudos voltados às ações de sustentabilidade e conservação.

Nesse sentido, a aquisição de conhecimentos voltados para a biologia reprodutiva dos animais da Caatinga é de fundamental importância para sua conservação. Além disso, o aprofundamento em tais informações é crucial para o desenvolvimento de biotécnicas que possibilitem a conservação e multiplicação de material genético desses animais. Dentre as formas de coleta de gameta masculino, a recuperação de espermatozoides epididimários pode ser a única possibilidade para se obter gametas de animais biologicamente valiosos que vieram a óbito (Martins et al., 2007). Além disso, é também uma alternativa a ser utilizada em espécies para as quais não há uma forma de coleta de sêmen definida (Silva et al., 2016).



Assim, o objetivo deste artigo de revisão é apresentar aspectos inerentes à recuperação, caracterização e criopreservação de espermatozoides epididimários de animais silvestres do bioma Caatinga, como preás, cutias, catetos e emas.

Técnicas de recuperação

A recuperação espermática diretamente do epidídimo permite a obtenção de células morfológicamente viáveis, as quais podem sofrer capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fecundar o oócito (Moreira *et al.*, 2021). O método para sua aplicação pode variar conforme a espécie animal, dependendo da dimensão do epidídimo e da escolha do manipulador, merecendo destaque os métodos da lavagem retrógrada e da flutuação (Bezerra *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2016).

A lavagem retrógrada consiste na aplicação de pressão no ducto deferente por meio de uma seringa injetando o diluente. A pressão é aplicada até que todo o conteúdo da cauda seja liberado por meio de uma incisão feita na junção da cauda com o corpo do epidídimo (Silva *et al.*, 2011). Esta técnica tem sido a de escolha para espécimes como os catetos, cutias e preás, pois proporciona uma menor contaminação por hemácias, apesar de obter um menor número de espermatozoides quando comparada a flutuação (Tab. 1)

A flutuação consiste no fatiamento da cauda do epidídimo, imerso em um meio tamponado, sendo os fragmentos deixados nesta solução por alguns minutos. Com isso, os espermatozoides são liberados diretamente no meio e depois são cuidadosamente recuperados por filtração (Silva *et al.*, 2016). Esta técnica é utilizada principalmente quando não é possível injetar o diluente do ducto deferente, como é o caso das emas, pois estas possuem o ducto deferente enovelado o que impossibilita a injeção do diluente. Logo para ema a flutuação foi a técnica ideal (Bezerra – dados não publicados).

Caracterização dos espermatozoides epididimários

Por meio da caracterização dos espermatozoides, é possível conhecer as particularidades de cada espécime, o que contribui significativamente para maximizar a eficiência reprodutiva e entender relações evolutivas entre diferentes grupos animais (Gago *et al.*, 1999). Dentre as espécies silvestres encontradas no bioma caatinga, algumas já tem relatos da caracterização dos espermatozoides oriundos do epidídimo, como a cutia, cateto, preá e ema.

A *Dasyprocta leporina*, popularmente chamada de cutia, teve seu primeiro relato de recuperação dos espermatozoides epididimários por Ferraz *et al.* (2011) por meio de lavagem retrógrada (Tab 1). Em 2022a, Dantas *et al.*, avaliaram os parâmetros espermáticos morfofuncionais de *D. leporina* ao longo do trânsito epididimário recuperados por flutuação (Tab. 1). Neste estudo foi verificado que há uma diminuição no tamanho do espermatozoide ao longo do trânsito epididimário, assim como, os gametas da cauda do epidídimo apresentaram os maiores valores de integridade de membrana com atividade mitocondrial (Dantas *et al.*, 2022b). Em adição, o mesmo grupo comparou a qualidade de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo entre o período seco e chuvoso no bioma caatinga, tendo concluído que o período chuvoso proporcionou melhores padrões cinéticos de motilidade total, motilidade progressiva, velocidade média de trajetória (VAP), velocidade em linha reta (VSL), velocidade curvilínea (VCL) e subpopulação de velocidade rápida (Dantas *et al.*, 2022cm). Em relação a morfometria, o espermatozoide da cauda do epidídimo de cutia apresenta comprimento de $35,14 \pm 0,07 \mu\text{m}$ e uma cabeça afilada sem proeminência do acrossoma (Dantas *et al.*, 2022a; Arroyo *et al.*, 2017).

Em catetos, o primeiro relato sobre coleta epididimária foi descrita por Bezerra *et al.* (2014), utilizando os métodos de flutuação e lavagem retrógrada, associados ou não com a centrifugação (Tab. 1). Os autores relatam que ambos os métodos podem ser usados para a recuperação de espermatozoides do epidídimo de catetos, entretanto, recomendam o uso da lavagem retrógrada, pois esse método está associado a uma menor incidência de contaminação espermática por hemácias. Além disso, o uso da centrifugação das amostras também não é recomendado, devido ao risco de aumentar o percentual dos defeitos de cauda, levando à diminuição da viabilidade dos espermatozoides. A respeito dos aspectos morfológicos, as células espermáticas apresentam um comprimento total de $50,68 \pm 0,12 \mu\text{m}$, com cabeças de formato alongado e discreto (Sousa *et al.*, 2013).

O preá (*Galae spixii* – Wagler, 1831) é um roedor de pequeno porte, e sua espermatogênese completa é verificada quando os animais atingem 120 a 150 dias de vida (Santos *et al.*, 2012). Primariamente descrito por Silva *et al.* (2016), os espermatozoides epididimários do preá foram coletados por flutuação e lavagem retrógrada, onde ambos métodos forneceram valores semelhantes para todos os parâmetros espermáticos



(Tab. 1). As células apresentaram $48,87 \pm 0,1 \mu\text{m}$ de comprimento total, sendo 9,4% desse valor, em média, referente ao comprimento da cabeça. Além disso, foi possível observar como uma característica marcante da célula, um acrossoma proeminente (Silva *et al.*, 2016).

As emas (*Rhea americana*) são nativas da América do Sul e distribuídas desde o Nordeste do Brasil até o sul da Argentina, sua população encontra-se em declínio, sendo classificada como quase ameaçada de extinção (BirdLife International, 2022). Em adição, estas aves possuem características sazonais e respondem ao fotoperíodo (Hicks-Allredge, 1996). Anatomicamente, o ducto epididimário é consideravelmente curto, e, portanto, o ducto deferente é considerado o principal órgão de armazenamento de espermatozoides na espécie (Hafez, 1988). Por meio da técnica de flutuação espermática, Jurema *et al.* (2022) descreveram os espermatozoides como estruturas filiformes com acrossomas pontiagudos, cabeças longas interligadas a uma pequena peça intermediária e uma longa cauda em forma de fio, totalizando $40,26 \pm 0,14 \mu\text{m}$ de comprimento. Bezerra *et al.* (2022a) utilizaram a flutuação para a obtenção de espermatozoides de toda a região do epidídimo e do canal deferente, onde constataram que as partes estruturais da célula aumentam de tamanho durante o trânsito espermático das emas.

Criopreservação de espermatozoides epididimários

A criopreservação é uma técnica amplamente utilizada nos estudos da biologia reprodutiva. Uma alternativa bastante interessante para a conservação animal é utilização da criopreservação de espermatozoides epididimários, principalmente para aqueles casos em que os animais foram submetidos a procedimento de esterilização cirúrgica ou em animais que vieram a óbito (Santos e Silva, 2022). A utilização de espermatozoides epididimários é uma fonte valiosa, sendo cada vez mais difundida e utilizada para a formação e manutenção dos biobancos que recebem amostras oriundas de animais de interesse comercial ou ameaçados de extinção (Tittarelli *et al.*, 2006).

É importante salientar que nem sempre os mesmos protocolos de criopreservação adotados para a coleta de amostras ejaculadas, poderiam ser extrapolados para a criopreservação epididimária. Esse fato pode ser reflexo principalmente, pela ausência de contato e ação prévia dos componentes do plasma seminal, um bom exemplo a ser mencionado aqui, foi relatado por Bezerra *et al.* (2018) que constataram que os diluentes utilizados para criopreservação de espermatozoides epididimários possuem efeitos contrários aos observados para amostras de espermatozoides ejaculados de catetos (Silva *et al.*, 2012). Em geral, o Tris foi o diluidor mais eficiente do que o ACP-116c para criopreservação de espermatozoides epididimários (Bezerra *et al.*, 2018), porém em amostras ejaculadas Silva *et al.* (2012) encontraram 48,3% e 30,4% de espermatozoides móveis para amostras diluídas em ACP-116c e Tris, respectivamente, após o descongelamento. Neste caso é indicado a utilização de ACP-116c para a criopreservação de sêmen e Tris para a criopreservação de espermatozoides epididimários de catetos.

Neste cenário, é indispensável a associação das técnicas mencionadas na busca de garantir o resgate e preservação dos gametas masculinos da fauna silvestre, assim como, o aprimoramento dos protocolos e meios de diluição aplicados para a criopreservação epididimária. Nos animais silvestres encontrados no bioma Caatinga as técnicas aqui mencionadas já foram aplicadas com sucesso na conservação de gametas masculinos em diversas espécies. Os resultados estão descritos em detalhes nesta revisão (Tab. 2).

Desafios e Perspectivas

Alguns desafios bem particulares surgem ao se trabalhar com espermatozoides epididimários. Em primeiro lugar, a maioria das investigações científicas se concentram em esforços para aumentar a eficácia de técnicas amplamente utilizadas, como a própria criopreservação convencional e as demais biotécnicas reprodutivas, negligenciando de certo modo, a recuperação e a criopreservação de espermatozoides epididimários (Nazari *et al.*, 2021). Em segundo lugar, os espermatozoides epididimários e as células espermáticas presentes no sêmen apresentam diferenças bem marcantes, principalmente no que diz respeito à exposição ao plasma seminal (Nazari *et al.*, 2021). É importante salientar, que na maioria dos mamíferos, os espermatozoides presentes no epidídimo apresentam-se estáticos e podem demandar tempo e meios compatíveis para induzir a motilidade (Prieto *et al.*, 2014). Ainda são inexistentes os meios de diluição específicos para a preservação de espermatozoides epididimários (Bertol, 2016).



Tabela 1. Valores (médios \pm erro padrão) para as características dos espermatozoides epididimários frescos coletados por flutuação e lavagem retrógrada

Espécie	Técnica de recuperação utilizado	Número de espermatozoides recuperados	Características espermáticas				Autores
			Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Viabilidade (%)	Integridade Funcional (%)	
Cutia	Flutuação	1375,0 \pm 244,1	73,3 \pm 6,4	--	83,5 \pm 3,4	83,3 \pm 3,9	Dantas et al., 2022b
	Lavagem retrógrada	748,0 \pm 418,66	86,5 \pm 3,37	--	66,0 \pm 5,2%	41,96 \pm 9,1%	Ferraz et al., 2011
Cateto	Flutuação						Bezerra et al, 2014
	Recuperado	1096,1 \pm 462,5	64,4 \pm 10,6	3,1 \pm 0,3	63,1 \pm 5,2	64,0 \pm 5,2	
	Centrifugado		61,1 \pm 10,5	2,9 \pm 0,4	50,5 \pm 3,4	50,5 \pm 3,9	
	Lavagem retrógrada						
	Recuperado	635,9 \pm 188,9	57,8 \pm 13,2	2,9 \pm 0,3	68,2 \pm 5,7	60,3 \pm 7,3	
	Centrifugado		40,0 \pm 10,8	2,2 \pm 0,4	53,8 \pm 3,8	56,2 \pm 4,9	
Preá	Flutuação	514,8 \pm 202,3	72,2 \pm 9,1	3,2 \pm 0,4	64,2 \pm 4,7	51,8 \pm 6,26	Silva et al., 2016
	Lavagem retrógrada	345,1 \pm 86,3	56,1 \pm 7,1	2,4 \pm 0,4	56,1 \pm 6,1	61,5 \pm 6,89	



Tabela 2. Visão geral dos estudos de criopreservação de espermatozoides epididimários já alcançados para animais silvestres do bioma Caatinga

Espécie	Método de recuperação	Diluentes + crioprotetores	Principais resultados/pós-descongelamento	Autores
Cutia (<i>Dasyprocta aguti</i>)	Lavagem retrógrada	ACP®-109c ou Tris + gema de ovo, acrescido de uma concentração final de 6% de glicerol no diluidor.	ACP-109: 26,5 ± 2,6% de espermatozoides móveis com vigor de 2,6 ± 0,2. Tris: 9,7 ± 2,6% de espermatozoides móveis com 1,2 ± 0,3 de vigor.	Silva et al., 2011
Cutia (<i>Dasyprocta leporina</i>)	Lavagem retrógrada	ACP® + 20% de gema de ovo, acrescido 6% de crioprotetor (glicerol, etilenoglicol, dimetilsulfóxido e dimetilformamida) no diluente.	Motilidade: Glicerol = 39,5 ± 4,6%; Etilenoglicol = 14,5 ± 3,5%; Dimetilsulfóxido = 29,5 ± 6,7%; Dimetilformamida = 7,5 ± 1,1%.	Castelo et al., 2015b
		ACP + 20% de gema de ovo, acrescido de glicerol ou dimetilsulfóxido em diferentes concentrações (3 ou 6%).	Motilidade: Glicerol (3%) = 47,5 ± 8,4%; Glicerol (6%) = 40,0 ± 8,4%; Dimetilsulfóxido (3%) = 39,1 ± 6,1%; Dimetilsulfóxido (6%) = 24,1 ± 8,0%.	
Cateto (<i>Pecari tajacu</i>)	Lavagem retrógrada ou Flutuação	ACP®-116c ou Tris + 20% de gema de ovo e 6% de glicerol.	O diluente Tris apresentou valores superiores de motilidade (49,8 ± 5,2%), vigor (3,3 ± 0,3) e viabilidade de (48,1 ± 3,7%). Foi comprovado também, que as amostras devem ser descongeladas a 37 °C/60s pois os resultados para viabilidade (54,1 ± 5,9%) e integridade funcional da membrana (43,2 ± 5,4%) foram superiores as demais taxas de descongelamento.	Bezerra et al., 2018
Preá-de-dentes-amarelos (<i>Galea spixii spixii</i>)	Lavagem retrógrada	Tris + 20 % de gema de ovo, com 3%, 6% ou 9% de glicerol ou dimetilsulfóxido.	6% de glicerol resultou nos melhores resultados para motilidade total (60,9 ± 4,4%), subpopulação de células rápidas (27,7 ± 3,1%) e capacidade de ligação espermática (227,0 ± 20,2).	Silva et al., 2018
Preá-de-dentes-amarelos (<i>Galea spixii Wagler, 1831</i>)	Lavagem retrógrada	ACP®-116c ou Tris suplementados com gema de ovo ou Aloe vera nas concentrações de 10% ou 20%.	Preservação mais efetiva da motilidade espermática (68,1 ± 5,9%) e integridade da membrana (48,2 ± 7,4%) foram encontradas nas amostras diluídas em Tris suplementado com 10% de gema de ovo.	Moreira et al., 2021
Ema (<i>Rhea americana</i>)	Flutuação	Meio comercial Ovodyl TSS™, acrescido de dimetilsulfóxido em diferentes concentrações (6%, 10%, 14% e 18%).	Nas diferentes concentrações de dimetilsulfóxido (6%,10%, 14% e 18%) foram obtidos os valores médios de 15,0 ± 10,0%; 10,0 ± 5,0%; 7,5 ± 2,5% e 7,5 ± 2,5% de espermatozoides móveis com vigor 1. Foram encontrados também os resultados de 15,5 ± 1,5%; 19 ± 4,0%; 15 ± 7,0% e 9,5 ± 6,5% para integridade da membrana e valores de 29,0 ± 3,0%; 35,5 ± 0,5%; 39,5 ± 3,5% e 28 ± 6,0% para funcionalidade da membrana, respectivamente.	Bezerra et al., 2022b



Outro ponto relevante, que precisa de atenção especial, está atrelado a elucidação e compreensão de todos os mecanismos que governam a fisiologia das células espermáticas, assim como, todas as modificações estruturais e funcionais que são desencadeadas durante as etapas dos protocolos de criopreservação (Cheuquemán et al., 2018). A exploração de substâncias aditivas oriundas do plasma seminal com características antioxidante ou até mesmo, ativadores de motilidade poderiam ser suplementos alternativos para preservar os aspectos de motilidade total e viabilidade das células espermáticas neste caso (Thuwanut et al., 2015).

Os espermatozoides epididimários, em condições controladas de reprodução assistida, podem apresentar resultados promissores. Para melhorar esses resultados, as biotécnicas reprodutivas mais avançadas poderiam auxiliar na implementação de programas de reprodução assistida em espécimes silvestres, como por exemplo, o emprego da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), principalmente quando os espermatozoides epididimários apresentassem motilidade insatisfatória (Prochowska et al., 2018). Além disso, poderiam ser aplicados investimentos na associação da ICSI com a criopreservação por liofilização, que é uma técnica altamente promissora para a formação de repositórios para amostras biológicas (biobancos) (Patrick et al., 2017).

Considerações finais

Recentes avanços na biotecnologia tornaram a recuperação e criopreservação de espermatozoides epididimários uma técnica promissora e viável para a conservação genética de espécies da fauna da Caatinga, e essa pode ser uma ferramenta valiosa nesse esforço. Contudo, a prévia caracterização e compreensão da biologia reprodutiva, com as particularidades fisiológicas de cada espécime, é essencial pois permite maior aplicabilidade das diferentes técnicas reprodutivas, maximizando os resultados desejados e contribuindo significativamente para conservação e multiplicação de espécies ameaçadas.

Referências

- Auer M, Wagner H, Failing K, Wehrend A.** Epididymis incision as a method to collect epididymal sperm cells in alpacas. *Vet Med Sci.* 2022 Jan;8(1):157-163.
- Bertol MAF.** Cryopreservation of Epididymal Sperm. *Cryopreservation in Eukaryotes.* InTech, 2016.
- Bezerra J, Silva A, Sousa P, Campos L, Praxedes E, Bezerra L, Silva AR.** Cryopreservation of collared peccary (*Pecari tajacu* L., 1758) epididymal sperm using extenders based on Tris and powdered coconut water (ACP®-116c). *Zygote*, v.26, n.4, p.301-307, 2018.
- Bezerra JAB, Silva AM, Peixoto GCX, Silva MA, Oliveira MF, Silva AR.** Influence of Recovery Method and Centrifugation on Epididymal Sperm from Collared Peccaries (*Pecari tajacu* Linnaeus, 1758). *Zoological Science*, v.31, p.338-342, 2014.
- Bezerra LGP, Silva AM, Jurema AP, Pereira AG, Dantas MRT, Oliveira MF, Comizzoli P, Silva AR.** Sperm morphological changes from the epididymis to the vas deference in rheas (*Rhea americana*). In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 9, 2022 JointMeeting. *Anais... JointMeeting: Animal Reproduction, 2022a.* Resumo.
- Bezerra LGP, Silva AM, Dantas MRT, Moreira SSSJ, Santos RP, Pereira AG, Oliveira MF, Silva AR.** First attempt at sperm cryopreservation in rhea (*Rhea americana*) - Preliminary results. In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction, 19-22, 2022, JointMeeting. *Anais... JointMeeting: Animal Reproduction, 2022b.* Resumo.
- Brasil.** Ministério do Meio Ambiente. Caatinga. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biomas/caatinga.html>. Acesso em 03 jan. 2023.
- Castelo, TS, Souza, ALP, Lima, GL., Peixoto, GCX, Campos, LB; Oliveira, MF, Silva, AR.** Interactions Among Different Devices and Electrical Stimulus on the Electroejaculation of Captive Agoutis (*Dasyprocta leporina*). *Reprod Domest Anim*, v.50, n.3, p.492-496, 2015a.
- Castelo TS, Silva AM, Bezerra LGP, Costa CYM, Lago AEA, Bezerra JAB, Campos LB, Praxedes ECG, Silva AR.** Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). *Cryobiology*, v.71, n.3, p.442-447, 2015b.
- Cheuquemán C, Faúndez R, Sánchez R, Risopatrón J.** Changes in sperm function and structure after freezing in domestic cat spermatozoa. *Andrologia*, v.50, n.9, v.1-8, 2018.
- Costa DS, Henry M, Paula TAR.** Espermatogênese de catetos (*Tayassu tajacu*). *Arq Bras Med Vet Zoot*, v.56, p 46-51, 2004.
- Costa GMJ, Leal MC, Ferreira CS, Guimarães DA, França LR.** 2010. Duration of spermatogenesis



and spermatogenic efficiency in 2 large neotropical rodent species: the agouti (*Dasyprocta leporina*) and paca (*Agouti paca*). *J Androl*, v.31, n.5, p.489-499, 2010.

Dantas MRT, Silva AM, Bezerra LGP, Pereira AG, Luz NRN, Souza-Junior JBF, Oliveira MF, Silva AR. Morphological, morphometric, ultrastructural, and functional evaluation of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*) sperm during epididymal transit. *Animal Reproduction Science*, v.243, 107029, 2022a.

Dantas MRT, Luz NRN; Bezerra, LGP; Moreira SSJ, Oliveira MF, Silva AR. Evaluation of sperm membrane functionality during epididymal transit in red rumped agouti (*Dasyprocta leporina*). *Reproduction in Domestic Animals*, v.57, p.912-918, 2022b.

Dantas, MRT. Características espermáticas de cutias (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) durante o trânsito epididimário e nas estações seca e chuvosa do bioma caatinga. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, 130F, 2022c.

Ferraz MS, Menezes DJA, Pessoa GT, Cabral RM, Illera MJ, Silva AR, Carvalho MAM. Collection and evaluation of epididymal sperm in captive agoutis (*Dasyprocta aguti*). *Theriogenology*, v.75, n.3, p.459-462, 2011.

Gago C, Pérez-Sánchez F, Yeung CH, Tablado L, Cooper TG, Soler C. Morphological characterization of ejaculated *Cynomolgus* Monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *Am J Primatol*, v.47, p.105-115, 1999.

Hafez ESE. Reprodução animal. 4.ed. São Paulo: Manole, 1988. p.503-515.

BirdLife International. 2022. *Rhea americana*. The IUCN Red List of Threatened Species 2022: e.T22678073A219615764. Accessed on 24 April 2023.

Jurema AP, Bezerra LGP, Silva AM, Dantas MRT, Pereira AG, Oliveira MF, Silva AR. Description of sperm morphometry and morphology in rhea (*Rhea americana*). *In: International Symposium on Animal Biology of Reproduction*, 8, 2020-2021, JoinMeeting. *Anais... JointMeeting: Animal Reproduction*, 2022. Resumo.

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.

Moreira SSJ, Silva AM, Souza ALP, Praxedes ECG, Souza Junior JBF, Pereira AF, Silva AR. Cryopreservation of Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm using Tris- and coconut water-based extenders supplemented with egg yolk or Aloe vera. *Cryobiology*, v.99, p.40-45, 2021.

Moreira SSJ, Silva AM, Souza ALP, Praxedes ECG, Souza-Junior JBF, Pereira AF, Silva AR. Cryopreservation of Spix's yellow-toothed cavy epididymal sperm using Tris- and coconut water-based extenders supplemented with egg yolk or *Aloe vera*. *Cryobiology*, v.99, p.40–45, 2021.

Silva MA, Peixoto GCX, Lima GL, Bezerra JA, Campos LB, Paiva AL, Paula VV, Silva AR. Cryopreservation of collared peccaries (*Tayassu tajacu*) semen using a powdered coconut water (ACP-116c) based extender plus various egg yolk and glycerol concentrations. *Theriogenology*, v.78, p.605-611, 2012.

Nazari H, Ahmadi E, Fahraji H, Afzali A, Davoodian N. Cryopreservation and its effects on motility and gene expression patterns and fertilizing potential of bovine epididymal sperm. *Vet Med Sci*, v,7, p.127-135. 2021.

Patrick J, Comizzoli P, Elliott G. Dry preservation of spermatozoa: considerations for different species. *Biopreserv Biobank*, v.5. n.2, p.158-168, 2017.

Prochowska S, Nizański W, Partyka A, Kochan J, Młodawska W, Nowak A, Skotnicki J, Grega T, Palys M. Influence of the type of semen and morphology of individual sperm cells on the results of ICSI in domestic cats. *Theriogenology*, v.131. p.140-145, 2018.

Prieto MT, Sanchez-Calabuig MJ, Hildebrandt TB, Santiago-Moreno J, Saragusty J. Sperm cryopreservation in wild animals. *Eur J Wildl Res*, v.60, p.851-864, 2014.

Santos PRS, Oliveira MF, Silva AR, Assis Neto AC. Development of spermatogenesis in captive-bred Spix's yellow-toothed cavy (*Galea spixii*). *Reproduction, Fertility and Development*, v.24, n.6, p.877, 2012.

Santos RP, Silva AR. Biobancos para a conservação da vida silvestre: desafios e perspectivas. *Rev Bras Reprod Anim*, v.46, n.4, p.413-430, 2022.

Silva AM, Bezerra JAB, Campos LB, Praxedes ÉCG, Lima GL, Silva AR. Characterization of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831) recovered by different methods. *Acta Zoologica*. v.98, n.3, p.285–291, 2016.

Silva AM, Praxedes ECG, Campos LB, Bezerra LGP, Moreira SSJ, Maia KM, Souza ALP, Silva AR. Epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies sperm successfully cryopreserved in Tris extender



with 6% glycerol and 20% egg yolk. *Anim Reprod Sci*, v.191, p.64-69, 2018.

Silva MA, Peixoto GCX, Santos EAA, Castelo TS, Oliveira MF, Silva AR. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology*, v.76, n.6, p. 1084–1089, 2011.

Sousa PC, Santos EAA, Souza ALP, Lima GL, Barros FFPC, Oliveira MF, Silva AR. Sperm morphological and morphometric evaluation in captive collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Pesq Vet Bras*. v.33, n.7, p.924–930.

Tabarelli M, Leal IR, Scarano FR, Silva JMC. Caatinga: legado, trajetória e desafios rumo à sustentabilidade. *Cienc Cult*, v.70, n.4, p.25–29, 2018.

Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, Sota RL. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*, v.66, n.6-7, p.1637–40, 2006.

Thuwanut P, Arya N, Comizzoli P, Chatdarong K. Effect of extracellular adenosine 5'-triphosphate on cryopreserved epididymal cat sperm intracellular ATP concentration, sperm quality, and in vitro fertilizing ability. *Theriogenology*, v.84, n.5, p.702-709, 2015.
