

## RECUPERAÇÃO E CONSERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE MAMÍFEROS

[Recovery and conservation of epididymal sperm from mammals]

Antônio Cavalcante Mota Filho<sup>1\*</sup>, Lúcia Daniel Machado da Silva<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Estadual do Ceará – UECE, Fortaleza, CE.

<sup>2</sup> Professora Doutora da Faculdade de Veterinária, UECE.

**RESUMO** - Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidas técnicas de colheita de sêmen em animais domésticos, como a massagem das ampolas dos ductos deferentes e massagem peniana, uso de vagina artificial e colheita direta da cavidade vaginal ou uterina. Contudo poucos estudos referentes à colheita de espermatozoides epididimários em animais domésticos até agora foram descritos. A recuperação de espermatozoides viáveis do epidídimo consiste em uma técnica importante para a obtenção de reservas de gametas de animais geneticamente valiosos ou de machos de espécies ameaçadas de extinção, constituindo-se em uma biotecnologia promissora para a reprodução dessas espécies. Uma vez recuperados os espermatozoides epididimários, faz-se necessário observar sua viabilidade, para posterior conservação. Assim, a presente revisão abordará esses pontos-chaves relacionados com os espermatozoides epididimários de diferentes espécies de mamíferos.

**Palavras-Chave:** Espermatozoide, epidídimo, animal.

**ABSTRACT** - Along the years, the techniques of semen collection of the domestic animals have been developed, such as: the massage of vesicular glands and ampullae by way of rectum, penis massage, artificial vagina and the directly collection from the vaginal or uterine cavity. However few works concerning the epididymal sperm collection of domestic animals were described. The recovery of viable sperm from the epididymis is an important technique to obtain genetic conservation of valuable animals or threatened species, constituting in an important biotechnology for the reproduction of those species. Once recovered, it is necessary to observe the viability, for its subsequent conservation. Thus, the present review will approach those key-points related to the epididymal sperms from different species of mammals.

**Keywords:** Spermatozoa, epididymis, animal.

### INTRODUÇÃO

Técnicas extremamente interessantes para a conservação da biodiversidade estão sendo desenvolvidas, destacando-se a recuperação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos; esses gametas, assim recolhidos são capazes de resistir após diferentes períodos, quando resfriados, até serem, posteriormente, criopreservados (Martins et al., 2007).

A obtenção de espermatozoides diretamente da cauda do epidídimo e ducto deferente consiste em uma técnica para os propósitos de reprodução assistida. Em geral, é um recurso importante em casos de animais de alto valor genético ou de grande estima, que precisam ser esterilizados ou que vêm a óbito. Tais espermatozoides obtidos por esta técnica

são morfológicamente viáveis e mantém a capacidade de sofrer capacitação, ligar-se à zona pelúcida e fecundar o oócito (Goodrowe & Hay, 1993; Tsutsui et al., 2003).

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

\* Autor para correspondência. E-mail: acmfmedvet@hotmail.com

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

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

Em vista da importância em se recuperar e armazenar os espermatozoides epididimários de diferentes espécies de mamíferos, a presente revisão visa abordar os principais tópicos relacionados às técnicas de armazenamento e transportes dos testículos e epidídimos, bem como a recuperação dos espermatozoides epididimários de diferentes espécies de mamíferos.

## ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

O epidídimo consiste de um longo ducto, altamente contorcido, que conecta os ductos eferentes ao ducto deferente. Dependendo da espécie, o comprimento do ducto epididimário pode variar de 3-4 metros, na espécie humana, até 80 metros como nos equinos. Morfologicamente, o epidídimo é geralmente dividido em três regiões: cabeça, corpo e cauda (Oliva et al., 2009).

Em um mamífero adulto, consiste em um ducto longo e enovelado revestido por epitélio pseudoestratificado, como observado para o coelho (Nicander, 1957), carneiro, touro e cavalo (Nicander, 1958), rato (Hamilton, 1975), cão (Orsi, 1983), hamster (Vicente & Orsi, 1987), gato (Viotto et al., 1988) e cuíca (Martinelli & Nogueira, 1992).

Nos mamíferos, o epidídimo possui diversas funções, ressaltando-se a reabsorção dos fluidos oriundos dos túbulos seminíferos, promovendo a

concentração e o transporte espermáticos, a eliminação dos espermatozoides defeituosos, bem como a maturação e o armazenamento dos normais. A função de armazenamento é ilustrada pelo fato dos espermatozoides ejaculados sobreviverem por cerca de 24 horas fora do epidídimo em meio diluidor; enquanto que os que são mantidos na cauda do epidídimo (*in vivo*) permanecem com boa viabilidade por mais de 15 dias (Muradás et al., 2006).

Esta viabilidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozoides. Durante o armazenamento, o epidídimo acumula espermatozoides que podem ou não ser utilizados na cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozoides do macho. Em touros e garanhões, o número de espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculações sucessivas, dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (Bedford, 1994).

## COLHEITA DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

A colheita de espermatozoides viáveis do epidídimo tem sido relatada nos suínos (Kikuchi et al., 1998), bovinos (Martins et al., 2009), ovinos (Lone et al., 2011; Tamayo-Canul et al., 2011), cervídeos (Martínez-Pastor et al., 2005ab, 2006; Fernández-Santos et al., 2009; Ake-Lopez et al., 2010), felinos (Titarelli et al., 2006; Gañán et al., 2009; Jiménez et al., 2011), caninos (Yu & Leibo, 2002; Ponglowhapan et al., 2006; Titarelli et al., 2006; Melo et al., 2008; Ponglowhapan & Chatdarong, 2008; Martins et al., 2009), equinos (Papa et al., 2008; Heise et al., 2010), asininos (Contri et al., 2012), camelos (Waheed et al., 2011), cutias (Silva et al., 2011), esquilos (Ping et al., 2011) e antílopes (Chatiza et al., 2011).

Muradás et al. (2006) demonstraram que o número total de espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo de garanhões é superior ao encontrado em ejaculados. Além disso, estas células apresentam motilidade progressiva igual ou superior aos espermatozoides do ejaculado (Tiplady et al., 2002).

O objetivo geral da obtenção de espermatozoides viáveis do epidídimo é a sua utilização em técnicas de reprodução assistida, como inseminação artificial (Papa et al., 2008; Heise et al., 2010) e injeção

intracitoplasmática de espermatozoides (Herrera et al., 2006).

Muitos métodos de recuperação são descritos e variam dependendo do autor e da espécie animal (Quadro 1). Nos animais de companhia, devido ao tamanho do epidídimo, o método de preferência é o fatiamento que consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo e deixar repousar em um meio diluidor, desta maneira, os espermatozoides migram para o meio e são recuperados através de filtração (Yu & Leibo, 2002). Esta técnica também é usada para obter amostras de espermatozoides dos animais de produção (Hishinuma et al., 2003).

Uma técnica similar consiste em fazer numerosos cortes na cauda do epidídimo de carneiros e pressionar suavemente a cauda e coletar os espermatozoides por extravasamento do líquido epididimário (Kaabi et al., 2003). Bartels et al. (2000) relataram que outra possibilidade é usar uma agulha e perfurar os túbulos do epidídimo de leões. Kishikawa et al. (1999) utilizaram pinças para

comprimir a cauda do epidídimo de camundongos e recuperar os espermatozoides.

Outro método consiste em promover um fluxo retrógrado na cauda do epidídimo aplicando pressão aos vasos deferentes até que o conteúdo da cauda saia através de um corte feito na junção com o corpo do epidídimo (Garde et al., 1994). A pressão é gerada com uma seringa, que injeta ar ou algum diluente inócuo aos espermatozoides (Lambrechts et al., 1999).

Segundo Martinez-Pastor et al. (2006), a colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo através do fluxo retrógrado é a técnica mais indicada, pois as amostras obtidas apresentam um menor nível de contaminação e são de melhor qualidade em relação aos outros métodos. Por outro lado, essa técnica possui a limitação de ser usada comumente para animais de produção devido ao tamanho do epidídimo e de ser mais complexa que as outras técnicas.

Quadro 1: Métodos de recuperação de espermatozoides epididimários nos mamíferos.

Métodos de recuperação de espermatozoides epididimários	Espécie	Autores
Fatiamento	Camundongos	Sankai et al., 2001; Kato et al., 2002
	Bovinos	Martins et al., 2009
	Caprinos	Martinez-Pastor et al., 2005b
	Asininos	Contri et al., 2012
	Cervos	Martinez-Pastor et al., 2005ab
	Caninos	Yu & Leibo, 2002; Martins et al., 2003
	Felinos	Titarelli et al., 2006; Gañán et al., 2009; Jiménez et al., 2011
	Camelos	Waheed et al., 2011
	Esquilos	Ping et al., 2011
	Antílope	Saragusty et al., 2006
Flutuação	Ovinos	Lone et al., 2011
Lavagem retrógrada	Caninos	Ponglowhapan et al., 2006
	Antílope	Chatiza et al., 2011
	Suíños	Kikuchi et al., 1998
	Equinos	Bruemmer et al., 2002; James et al., 2002; Tiplady et al., 2002; Neild et al., 2006; Papa et al., 2008; Heise et al., 2010
	Ovinos	Garde et al., 1994
	Cutias	Silva et al., 2011
Perfuração	Leões	Bartels et al., 2000

## TRANSPORTE DO COMPLEXO TESTÍCULO EPIDÍDIMO EPIDIDIMÁRIO

Pesquisas têm avaliado a viabilidade espermática em função do tempo de armazenamento do epidídimo possibilitando, assim, a definição das melhores formas de acondicionamento e transporte do material até um centro de reprodução capacitado para a recuperação e criopreservação destas células (James et al., 2002, Granemann et al., 2006; Muradás et al., 2006).

Os epidídimos podem ser transportados refrigerados para laboratórios de andrologia ou, ainda, processados no próprio local por um técnico especializado (Bruemmer et al., 2002). Espermatozoides que são recuperados de epidídimos refrigerados a 5 °C por 24 horas têm apresentado boa congelabilidade em diferentes espécies (Marks et al., 1994; Blash et al., 2002; Soler et al., 2003).

Pesquisas conduzidas com complexo testículo-epidídimo que foram mantidos em temperatura ambiente por até 5 horas, não detectaram grandes alterações na motilidade espermática (Schäfer & Holzmann, 2000). Resultados semelhantes foram obtidos mantendo-se os mesmos sob refrigeração a 5 °C *overnight* (Goodrowe & Hay, 1993). Estudos conduzidos para a recuperação de espermatozoides do epidídimo de cães utilizando a solução de Ringer sem lactato mostraram que essa solução é eficiente para a recuperação das células espermáticas (Martins et al. 2003); a solução fisiológica 0,9% também tem se mostrado eficiente para esse propósito nos cães e nos gatos (Martins et al., 2006).

Estudos realizados em cães demonstraram que não há um decréscimo significativo na integridade das membranas e do acrossomo em espermatozoides provenientes do epidídimo quando armazenado por 48 horas a 4 °C. Em contraste, foi observado que a motilidade espermática diminuiu significativamente nas primeiras 5 horas de refrigeração; após esse período o decréscimo foi mais lento. Neste estudo, alguns espermatozoides recuperados do epidídimo apresentaram motilidade e capacidade de ligação à zona pelúcida após um período de armazenamento de oito dias à temperatura de 4 °C. (Yu & Leibo, 2002).

Resultados da avaliação *in vitro* demonstraram que a concentração de espermatozoides recuperados do epidídimo é semelhante àquelas descritas, na espécie canina, no ejaculado (Johnston et al., 2001). No entanto, a falta de conhecimento técnico específico sobre o armazenamento e transporte do epidídimo, muitas vezes inviabiliza a preservação espermática

em decorrência da degeneração tecidual pós-morte na espécie equina (James et al., 2002).

## QUALIDADE DOS ESPERMATOZOIDES COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

Martinez-Pastor et al. (2005b) pesquisaram os efeitos do tempo *post mortem* (até quatro dias) sobre o complexo testículo epididimário cervídeos resfriado a 5 °C e observaram boa qualidade seminal (motilidade 40% e morfologia 60%) por até 72 horas pós-refrigeração permitindo o seu uso em programas de inseminação artificial.

Kaabi et al. (2003) estudaram os efeitos do intervalo entre a morte de carneiros e a recuperação de seus espermatozoides da cauda do epidídimo armazenada à temperatura ambiente e à 5 °C (0, 24 e 48 horas), sobre a qualidade e capacidade de fecundação dos espermatozoides. Eles observaram que as amostras se mantiveram viáveis por até 24 e 48 horas após a morte dos animais, para epidídimos armazenados em temperatura ambiente e resfriados, respectivamente; contudo a qualidade diminuiu significativamente após esses períodos. Epidídimos conservados a 5 °C tinham melhor motilidade espermática e maior porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais do que os armazenados à temperatura ambiente por mais de 24 horas. A capacidade de fecundação dos espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo até 24 horas *post mortem* foi semelhante à do ejaculado.

Kato et al. (2002) colheram espermatozoides da cauda do epidídimo de camundongos e os espermatozoides foram incubados em meio diluidor (Ringer-Krebs bicarbonato modificado) em estufa de CO<sub>2</sub> a 37 °C e avaliaram sua motilidade e integridade do acrossoma, 1, 3 e 5 horas, pós-orquiectomia e observaram queda significativa da motilidade após 5 horas e nenhuma alteração significativa da integridade acrossômica.

A colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo em ganhões mostrou-se eficiente na recuperação de células espermáticas viáveis (James et al., 2002; Tiplady et al., 2002; Melo et al., 2008; Papa et al., 2008). Bruemmer et al. (2002) observaram que não existem diferenças significativas na motilidade de espermatozoides epididimários de ganhões, avaliados logo após a orquiectomia e 24 horas depois, desde que o epidídimo seja mantido resfriado a 5 °C. James et al. (2002) demonstraram que espermatozoides epididimários viáveis de ganhões podem ser colhidos por até 96 horas *post mortem*, desde que testículos/epidídimos sejam

mantidos resfriados a 4 °C. Neste estudo não houve diferença no percentual de motilidade progressiva e na integridade de membrana avaliados após a refrigeração por 96 horas.

Em cervídeos, Martinez-Pastor et al. (2005a) avaliaram os parâmetros espermáticos em função do tempo *post mortem*, observando valores satisfatórios até 48 horas, por 5°C. Os autores constataram ainda que o parâmetro espermático mais afetado durante o armazenamento foi a motilidade espermática. Estudos com ratos, caprinos, equinos e bovinos demonstraram que a maioria destas espécies possui melhor viabilidade seminal quando os testículos são armazenados entre 4 e 5 °C, comparados com os mantidos à temperatura ambiente (James, 1997).

Após 24 horas pós-orquiectomia a temperatura ambiente, os espermatozoides epididimários de garanhões tiveram uma redução na qualidade espermática. Este decréscimo pode ser explicado pelo esgotamento metabólico dos espermatozoides, assim como, pelo processo de degeneração tecidual *post mortem*. Temperaturas mais baixas retardam o processo de degeneração, pois diminuem o metabolismo dos espermatozoides mantendo-os viáveis por mais tempo (Granemann et al., 2006).

Outros estudos avaliaram a viabilidade espermática após o armazenamento do epidídimo a 5 °C por 24 horas. Estes estudos realizados em cervídeos (Soler et al., 2003), canídeos (Marks et al., 1994) e equídeos (Bruemmer et al., 2002; Papa et al., 2008) demonstraram que os espermatozoides recuperados foram processados e congelados com sucesso. No entanto, poucos estudos compararam a fertilidade destes espermatozoides com a dos espermatozoides do ejaculado.

### CONGELAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS

Os processos de congelação e descongelação podem provocar danos na capacidade de motilidade e fecundação por alterações na membrana plasmática do espermatozoide (Watson, 1995). Uma das alterações da membrana ocorre devido a lavagens ou diluições que podem remover proteínas da membrana plasmática, mudando assim a composição das mesmas (Hammerstedt et al., 1990; Collin & Bailey, 1999). As proteínas, quando removidas, podem modificar a relação dos lipídios impedindo o processo de reação acrossômica. A estabilidade de lipídios na membrana plasmática é pré-requisito para manter a função do espermatozoide (Watson, 1995). Enquanto a congelação feita em condições

adequadas (velocidade de abaixamento de temperatura e uso de crioprotetores) evita a formação de grandes cristais de gelo intracelular, ela leva a um aumento dos danos por efeitos de solução. Portanto, a taxa de congelação para um dado tecido depende de sua tolerância relativa ao dano causado pelos cristais de gelo e da toxicidade dos efeitos de solução (Hafez & Hafez, 2004).

Soler et al. (2003) demonstraram os efeitos da viabilidade e fertilidade de espermatozoides epididimários criopreservados e descongelados de cervídeos, em diferentes protocolos de descongelação (37 °C por 20 segundos; 60 °C por 8 segundos; 70 °C por 5 segundos), o referido autor observou que o primeiro protocolo de descongelação foi o mais adequado, pois apresentou melhor motilidade espermática (76,8%).

Kikuchi et al. (1998) pesquisaram a influência do tempo *post mortem* na motilidade e capacidade de fertilização *in vitro* e calcularam os oócitos maduros, oócitos penetrados e com pró-núcleo masculino de espermatozoides epididimários de cachorros orquiectomizados, sendo os espermatozoides criopreservados logo após a orquiectomia, no grupo controle e 24, 48 e 72 horas após, sendo estes espermatozoides mantidos resfriados a 4 °C em meio *Niwa and Sasaki Freezing*, sendo o grupo controle, espermatozoides ejaculados criopreservados. A motilidade dos espermatozoides criopreservados até 48 horas pós-orquiectomia não diferiu do grupo controle, já a capacidade de fecundação foi significativamente menor, com boa viabilidade nos espermatozoides criopreservados até 24 horas.

### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A recuperação de espermatozoides epididimários pode ser uma alternativa para resgatar o potencial reprodutivo de alguns animais, sejam eles domésticos ou selvagens. Dessa maneira, é de crucial importância não somente o domínio da técnica de colheita dos espermatozoides epididimários, mas também o transporte e a conservação desses gametas para que eles estejam viáveis para uma utilização futura com sucesso.

### AGRADECIMENTOS

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP) pela concessão da bolsa de estudos do doutorando Antônio Cavalcante Mota Filho, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

pela concessão da bolsa de pesquisadora à Lúcia Daniel Machado da Silva e apoio financeiro para o desenvolvimento das pesquisas do Laboratório de Reprodução de Carnívoros.

## REFERÊNCIAS

- Ake-Lopez J., Cavazos-Arizpe E., Magana-Monforte J.G., Centurion-Castro F. & Silva-Mena C. 2010. Effect of age and postmortem time on some white-tailed deer (*Odocoileus virginianus texanus*) epididymal sperm characteristics and response of cryopreservation. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 5:183-186.
- Axnér E., Hermansson U. & Linde-Forsberg C. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 84:179-191.
- Bartels P., Lubbe K., Kilian I., Friedman Y., Van Dick G. & Mortimer D. 2000. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozen-thawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology*. 53:325.
- Bedford J.M. 1994. The status and the state of the human epididymis. *Human Reproduction*. 9:2187-2199.
- Blash S., Melican D. & Gavin W. 2002. Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*. 54:899-905.
- Bruemmer J.E., Reger H., Zibinski G. & Squires E.L. 2002. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 58:405-407.
- Chatiza F.P., Pieterse G.M., Bartels P & Nedambale T.L. 2011. Characterization of epididymal spermatozoa motility rate, morphology and longevity of springbok (*Antidorcas marsupialis*), impala (*Aepyceros melampus*) and blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*): Pre- and post-cryopreservation in South Africa. *Animal Reproduction Science*. 126:234-244.
- Collin S & Bailey J.L. 1999. Assessment of intracellular calcium levels in cryopreserved bovine sperm by flow cytometry. *Theriogenology*. 51:341.
- Contri A., Gloria A., Robbe D., I. De Amicis I & Carluccio A. 2012. Characteristics of donkey spermatozoa along the length of the epididymis. *Theriogenology*. 77:166-173.
- Fernández-Santos M.R., Martínez-Pastor F., Matias D., Domínguez-Rebolledo A.E., Esteso M.C., Montoro V. & Garde J.J. 2009. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 111:93-104.
- Gañán N., Gomendio M. & Roldan E.R.S. 2009. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology*. 72:1268-1277.
- Garde J., Aguado M., Pérez S., Garrido D., Pérez-Guzmán M. & Montoro V. 1994. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology*. 41:203.
- Goodrowe K.L & Hay M. 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 40:967-975.
- Granemann L.C., Weiss R.R., Kozicki L.E., Muradás P.R. & Tremblé T.E. 2006. Número total de espermatozoides de garanhões obtidos através da colheita com vagina artificial e por fluxo retrógrado da cauda do epidídimo. *Archives of Veterinary Science*. 11:73-77.
- Hafez E.S.E. & Hafez, B. 2004. *Reprodução Animal*. Editora Manole. 7ªed. p. 381-470.
- Hamilton D.W. 1975. Structure and function of the epithelium lining the ductuli efferentes; ductus epididymis and ductus deferens in the rat, p. 259-301. In: Hamilton, D.W. & Greep, R.O. (ed.) *Handbook of Physiology*. v. 5. Washington D.C.: American Physiological Society.
- Hammerstedt R.H., Graham J.K. & Nolan, J.P. 1990. Cryopreservation of mammalian sperms: what we ask them to survive. *Journal of Andrology*. 11:73-88.
- Heise A., Kähn W., Volkmann D.H., Thompson P.N. & Gerber D. 2010. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 118:48-53.
- Herrera C., Miragaya H.M., Conde P., Hynes V., Losinno L., Quintans C. & Pasqualini R.S. 2006. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*. 94:299-302.
- Hewitt D.A., Leahy R., Sheldon I.M. & England G.C. 2001. Cryopreservation of epididymal dog sperm. *Animal Reproduction Science*. 67:101-111.
- Hishinuma M., Suzuki K. & Sekine, J. 2003. Recovery and cryopreservation of sika deer (*Cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology*. 59:813-820.
- James A.N. 1997. *Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis*. Tese da Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 234p.
- James A.N., Green H., Hoffman S., Landry A.M., Paccamonti D. & Godke R.A. 2002. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology*. 58:401-404.
- Jiménez E. C.C. Pérez-Marín, Y. Millán & E. Agüera. 2011. Influence of anaesthetic drugs on the epididymal sperm quality in domestic cats. *Animal Reproduction Science*. 123:265-269.
- Johnston S.D., Kustritz M.V.R. & Oslon P.N.S. 2001. Semen collection, evaluation and preservation, p. 287-306. In: Johnston S.D., Kustritz M.V.R. & Oslon P.N.S. (ed.) *Canine and Feline Theriogenology*. WB Saunders, Philadelphia.
- Kato M., Makino S., Kimura H., Ota T., Furuhashi T., Nagamura Y & Hirano K. 2002. In vitro evaluation of acrosomal status and motility in rat epididymal spermatozoa treated with  $\alpha$ -chlorohydrin for predicting their fertilizing capacity. *Journal of Reproduction and Development*. 48:461-468.
- Kikuchi K., Nagai T., Kashiwazaki N., Ikeda H., Noguchi J & Shimada A. 1998. Criopreservation and ensuing in vitro fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology*. 50:615-623.
- Kishikawa H., Tateno H & Yanagimachi R. 1999. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. *Journal of Reproduction and Fertility*. 116:217-222.
- Kolbe T & Holtz W. 1999. Intracytoplasmic injection (ICSI) of in vivo or in vitro matured oocytes with fresh ejaculated or frozen-thawed epididymal spermatozoa and additional calcium-ionophore activation in the pig. *Theriogenology*. 52:671-682.
- Kaabi M., Paz P., Alvarez M., Anel E., Boixo J.C., Rouissi H., Herraiz P. & Anel L. 2003. Effect of epididymis handling

- conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*. 60:1249-1259.
- Lambrechts H., Niekerk F., Coetzer F.W., Cloete S & Van der Horst, G. 1999. The effect of cryopreservation on the survivability, viability and motility of epididymal African buffalo (*Syncerus caffer*) spermatozoa. *Theriogenology*. 52:1241-1249.
- Lone F.A., R. Islam, M.Z. Khan & K.A. Sofi. 2011. Effect of transportation temperature on the quality of cauda epididymal spermatozoa of RAM. *Animal Reproduction Science*. 123:54-59.
- Marks S.L., Dupuis J., Mickelsen W.D., Memon M.A. & Platz C.C. Jr. 1994. Conception by use of postmortem epididymal semen extraction in a dog. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 15:1639-1640.
- Martinelli P. M & Nogueira J. C. 1992. Epididymal morphology in the south American marsupial *Marmosa cinerea*, Temminck, 1824. *Revista Brasileira de Ciências Morfológicas*. 9:26-31.
- Martinez-Pastor F., Corujo A.R.D., Anel E., Herraes P., Paz, P & Anel L. 2005a. Post mortem time and season alter subpopulation characteristics of Iberian red deer epididymal sperm. *Theriogenology*. 64:958-974.
- Martinez-Pastor F., Guerra C., Kaabi M., Diaz A.R., Anal E., Herraes P., & Paz P., Anel L. 2005b. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology*. 63:24-40.
- Martinez-Pastor F., Garcia-Macias V., Alvarez M., Chamorro C., Herraes P., Paz P & Anel L. 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*. 65:471-485.
- Martins C.F., Rumpf R., Pereira D.C & Dode M.N. 2007. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses *in vitro* embryo production. *Animal Reproduction Science*. 101:326-331.
- Martins C.F., Driessen K., Costa P.M., Carvalho-Neto J.O., Sousa R.V., Rumpf R & Dode M.N. 2009. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5 °C by different periods of time. *Animal Reproduction Science*. 116:50-57.
- Martins M.I.M., Souza F.F., Chirinéa V.H., Tebet J.M & Lopes M.D. 2003. Viabilidade de espermatozoides criopreservados, obtidos do epidídimo de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 27:367-368.
- Martins M.I.M., Justino R.C., Pereira F.D., Perches C.S., Chirinéa V.H & Lopes M.D. 2006. The effect of two solutions in the morphological characteristics and in the freezing of spermatozoa obtained from epididymis of dogs and cats: preliminary results. *Animal Reproduction*. 3:265.
- Melo C.M., Papa F.O., Fioratti E.G., Villaverde A.I.S.B., Avanzi B.R., Monteiro G., Dell'Aqua Jr. J.A., Pasquini D.F & Alvarenga M.A. 2008. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Animal Reproduction Science*. 107:331.
- Muradás P.R., Weiss R.R., Kozicki L.E., Granemann L.C., Santos I.W & Pimpão C.T. 2006. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozoides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. *Archives of Veterinary Science*. 11:69-74.
- Neild D., Miragaya M., Chaves G., Pinto M., Alonso A., Gambarotta M., Losinno L & Agüero A., 2006. Cryopreservation of cauda epididymis spermatozoa from slaughterhouse testicles 24 hours after ground transportation. *Animal Reproduction Science*. 94:92-95.
- Nicander, L. 1957. On the regional histology and cytochemistry of the epididymis in the rabbits. *Acta Morphologica Neerland Scandinava*. 1:99-118.
- Nicander, L. 1958. Studies on the regional histology and cytochemistry of the ductus epididymidis in stallions, rams and bulls. *Acta Morphologica Neerland Scandinava*. 1:337-362.
- Oates R.D., Lobel S.M., Harris D.H., Pang S., Burgess C.M & Carson R.S. 1996. Efficacy of intracytoplasmic sperm injection using intentionally cryopreserved epididymal spermatozoa. *Human Reproduction*. 11:133-138.
- Oliva S. U., Rinaldo P. A & Stumpp T. 2009. Biologia epididimária: Maturação espermática e expressão gênica. *O Mundo da Saúde*. 33:419-425.
- Orsi A.M. 1983. Regional histology of the epididymis of the dog. A light microscope study. *Anatomischer Anzeiger*. 153:441-445.
- Papa F.O., Melo C.M., Fioratti E.G., Dell'Aqua Jr. J.A., Zahn F.S & Alvarenga M.A. 2008. Freezing of stallion epididymal sperm. *Animal Reproduction Science*. 107:293-301.
- Ping S., Wang F., Zhang F., Wu C., Tang W., Luo Y. & Yang S. 2011. Cryopreservation of epididymal sperm in tree shrews (*Tupaia belangeri*). *Theriogenology*. 76:39-46.
- Ponglowhapan S. & Chatdarong K. 2008. Effects of Equex STM Paste on the quality of frozen-thawed epididymal dog spermatozoa. *Theriogenology*. 69:666-672.
- Ponglowhapan S., Chatdarong K., Sirivaidyapong S., Lohachit C. 2006. Freezing of epididymal spermatozoa from dogs after cool storage for 2 or 4 days. *Theriogenology*. 66:1633-1636.
- Sankai T., Tsuchiya H & Ogonuki N. 2001. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 55:1759-1768.
- Santiago-Moreno J., Toledano-Díaz A., Pulido-Pastor A., Dorado J., Gómez-Brunet A. & López-Sebastián A. 2006. Effect of egg yolk concentration on cryopreserving Spanish ibex (*Capra pyrenaica*) epididymal spermatozoa. *Theriogenology*. 66:1219-1226.
- Saragusty J., Gacitua H., King R & Arav A. 2006. Post-mortem semen cryopreservation and characterization in two different endangered gazelle species (*Gazella gazella* and *Gazella dorcas*) and one subspecies (*Gazella gazelle acaiae*). *Theriogenology*. 66:775-784.
- Schäfer S. & Holzmann A. 2000. The use of transmigration and Spermac® stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 59:201-211.
- Silva M.A., G.C.X. Peixoto., E.A.A. Santos., T.S. Castelo., M.F. Oliveira & A.R. Silva. 2011. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology*. 76:1084-1089.
- Soler A.J., Garcia A.J., Fernández-Santos M.R., Estes M.C & Garde J.J. 2003. Effects of thawing procedure on postthawed *in vitro* viability and *in vivo* fertility of Red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196°C. *Journal of Andrology*. 24:746-756.
- Tamayo-Canul J., Alvarez M., López-Uruña E., Nicolas M., Martinez-Pastor F., Anel E., Anel L. & de Paz P. 2011. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Animal Reproduction Science*. 126:76-82.
- Tebet J. Martins M.I.M., Chirinéa V.H., Souza F.F., Campagnol D & Lopes M.D. 2006. Cryopreservation effects on domestic cat

epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*. 66:1629-1632.

Tiplady C.A., Morris L.H.A & Allen W.R. 2002. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology*. 58:225-228.

Tittarelli C., Savignone C.A., Arnaudín E., Stornelli M.C., Stornelli M.A & de la Sota R.L. 2006. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology*. 66:1637-1640.

Tsutsui T., Wada M., Anzai M & Hori T. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *Journal of Veterinary Medical Science*. 65:397-399.

Vicentini C.A & Orsi A.M. 1987. Histologia regional do epidídimo no hamster champanha (*Mesocricetus auratus*). *Revista Brasileira de Biologia*. 47:277-281.

Viotto M.J.S., Orsi A.M., Mello Dias S., Fernandez W.A & Camilli J.A. 1988. Histologia regional do epidídimo do gato (*Felis domestica*, L.). *Ciência e Cultura*. 40:1195-1199.

Waheeda M.M., Al-Eknah M.M. & El-Bahr M.M. 2011. Some biochemical characteristics and preservation of epididymal camel spermatozoa (*Camelus dromedarius*). *Theriogenology*. 76:1126-1133.

Watson P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reproduction, Fertility and Development*. 7:871-891.

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