

Nascimento de bezerros normais após inseminação artificial utilizando espermatozoides criopreservados obtidos de epidídimos refrigerados de bovinos após a morte

Birth of normal calves after artificial insemination using cryopreserved spermatozoa obtained from refrigerated epididymides of death bovine

Priscila de Melo Costa^I Carlos Frederico Martins^{LIH*} Vanessa de Oliveira Franco^I
Luiz Osvaldo Fonseca Rezende^{II} José Robson Bezerra Sereno^{II} Haroldo da Costa Ferreira Campos^{II}

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar as características morfológicas e funcionais dos espermatozoides bovinos recuperados de epidídimos resfriados por longos períodos e posteriormente criopreservados. Testículos bovinos foram coletados no abatedouro, transportados ao laboratório e armazenados a 5°C por 0, 24, 48 e 72 horas (n=10 para cada tratamento). Os espermatozoides foram extraídos de cada epidídimo, avaliados e diluídos em meio tris-gema-glicerol a 7% e criopreservados em nitrogênio líquido. As características morfológicas e funcionais dos espermatozoides foram avaliadas in vitro por análise microscópica e in vivo, por meio de inseminação artificial. Foram observadas alterações morfológicas características da imaturidade dos espermatozoides e redução da motilidade após 72 horas de refrigeração dos epidídimos. Esses parâmetros também foram alterados após o descongelamento, em todos os tratamentos. A manutenção dos espermatozoides a 5°C por 72h reduziu a motilidade espermiática. Em todos os tratamentos foram observadas alterações morfológicas características da imaturidade dos espermatozoides e redução da motilidade após o descongelamento. A integridade de membrana plasmática e acrossoma somente foram afetadas pós criopreservação nos grupos mantidos a 5°C durante 48 ou 72h antes da criopreservação. Contudo, a capacidade de fecundação dos espermatozoides mantidos a 5°C durante 24 ou 72h antes da criopreservação foi suficiente para promover duas gestações e nascimento de bezerros saudáveis. Esses resultados indicam que a recuperação e a criopreservação de espermatozoides obtidos de epidídimos mantidos a 5°C, até 72h, provenientes de animais mortos é uma opção viável para preservar gametas masculinos para compor um banco de germoplasma.

Palavras-chave: *animais mortos, biotecnologia, germoplasma.*

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the morphological and functional characteristics of bovine spermatozoa retrieved from chilled epididymides for long periods and cryopreserved. Bovine testicles were collected in abattoir; transported to the laboratory and stored at 5°C for 0, 24, 48h e 72 hours (n=10 for each storage time treatment group). The spermatozoa were retrieved from each epididymides, evaluated and diluted in tris-egg yolk-glycerol 7% medium and cryopreserved in liquid nitrogen. The morphological and functional characteristics of the spermatozoa were analyzed in vitro, by microscopic evaluation and in vivo, using artificial insemination. Morphological alterations as sperm immaturity and motility reduction decreased after 72h of epididymides refrigeration and after thaw sperm were observed. The membrane and acrosome integrity were only affected in G48 and G72 groups after cryopreservation. However, the sperm capacity of fertilization post-cryopreservation was sufficient to promote two pregnancies and birth of healthy calves from G24 h and G72h groups. These results indicated that recovery and cryopreservation of chilled epididymal sperm until 72h from dead animals is a viable option to preserve male gametes to compose a germplasm bank.

Key words: *dead animals, biotechnology, germplasm.*

INTRODUÇÃO

Material genético tanto de animais de interesse econômico como de animais silvestres pode ser perdido a qualquer momento por morte animal.

^IDepartamento de Biologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Centro Universitário de Brasília (UnICEUB), Brasília, DF, Brasil.

^{II}Embrapa Cerrados, Laboratório de Reprodução Animal, Br 020, km 18, 73310-970, Planaltina, DF, Brasil. E-mail: carlos.frederico@cpac.embrapa.br. *Autor para correspondência.

Nesse caso, esforços podem ser realizados por meio da utilização das técnicas de reprodução assistida para evitar a perda total deste material genético de importância.

A recuperação e a criopreservação de espermatozoides do epidídimo de animais mortos (recuperação pós-morte) é uma opção viável para preservar gametas masculinos e dessa forma manter um banco de germoplasma (TITTARELLI et al., 2006). Os procedimentos de isolamento de espermatozoides do epidídimo de animais mortos, a criopreservação e subsequente utilização para a fecundação *in vitro*, são importantes ferramentas para resgatar material genético que poderia ser perdido, tanto de animais de produção como em espécies em extinção (MARTINS et al., 2007).

A cauda do epidídimo fornece um ambiente adequado para estocar gametas em situações fisiológicas e, assim, pode prolongar a sobrevivência espermática (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2009). Apesar de a cauda do epidídimo oferecer boas condições para manter a viabilidade espermática, quando longos períodos são necessários até a recuperação dos espermatozoides, a refrigeração do epidídimo é necessária para minimizar os efeitos sobre os espermatozoides (YU & LEIBO, 2002; MARTÍNEZ-PASTOR et al., 2005).

Considerando a importância de se recuperar espermatozoides que seriam perdidos pela morte animal, o objetivo deste trabalho foi estudar as características morfológicas e funcionais dos espermatozoides bovinos recuperados de epidídimos resfriados a 5°C por 0, 24, 48 e 72 horas e posteriormente criopreservados em nitrogênio líquido. Nesse caso, a inseminação artificial foi utilizada para avaliar o potencial de fecundação *in vivo* dos espermatozoides criopreservados após 24 ou 72 horas de refrigeração dos epidídimos.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Ciências da Saúde do UniCEUB, em Brasília, DF, no Laboratório de Reprodução Animal e no Campo Experimental da Embrapa Cerrados, em Planaltina, DF, e no Centro de Transferência de Tecnologias em Raças Zebuínas com Aptidão Leiteira-CTZL, localizado no Gama, DF.

Testículos bovinos foram coletados no abatedouro, isolados do escroto e transportados em caixa de isopor à temperatura ambiente para o laboratório. No laboratório, 10 testículos por tratamento foram armazenados a 5°C por 0 (G0), 24 (G24), 48 (G48) e 72 horas (G72).

Após cada período de armazenamento, os espermatozoides foram recuperados da cauda dos

epidídimos para avaliação da viabilidade. Para isso, os epidídimos foram separados dos testículos e lavados duas vezes com álcool 70% por um período de 10min. Várias incisões foram realizadas na cauda do epidídimo e então por pressão manual os espermatozoides foram liberados e coletados em tubos graduados de 15mL. As células recuperadas foram avaliadas quanto à motilidade, vigor, concentração, morfologia, integridade de membranas plasmáticas e acrossomal, antes e após a criopreservação. A motilidade (%) e vigor (0-5; sendo 0 para espermatozoides sem movimento e 5 para espermatozoides com movimento progressivo rápido e linear) foram avaliados em microscópio de contraste de fase em aumento de 200 vezes. A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer na diluição de 1:200 e os resultados foram expressos em espermatozoides mL⁻¹. A morfologia espermática foi avaliada logo após o período de resfriamento de cada grupo. Para essa análise, foi utilizado um microscópio de contraste de fase em aumento de 1000×. Um total de 200 células foi contado para cada animal e os resultados da média das patologias de cabeça, peça intermediária e cauda dos espermatozoides de todos os animais do experimento foram apresentados em porcentagem. A avaliação da integridade de membrana plasmática e acrossoma foram realizadas em microscópio ótico como descrito por DIDION et al. (1989) com algumas modificações. Para isso, uma amostra de 20µL da amostra de espermatozoide foi incubada com 20µL do corante *trypan blue* a 0,2% na temperatura de 37°C por 10min e, em seguida, centrifugada a 700×g por 6min. O *pellet* foi ressuspendido com 0,5mL do meio *Tyrodé's albumin lactate pyruvate* (TALP) (PARRISH et al., 1995), e três esfregaços de cada tratamento foram preparados. Os esfregaços foram fixados com metanol por 5 min, secos e corados *overnight* com Giemsa a 10%. Os esfregaços foram avaliados contando-se 200 espermatozoides e os resultados foram apresentados como porcentagem de espermatozoides vivos com acrossoma intacto.

Após cada período de armazenamento, os espermatozoides recuperados foram avaliados e diluídos com meio tris-gema-glicerol a 7% em tubos de 15mL. Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25mL na concentração total de 15×10⁶ células e equilibradas por 4 horas a 5°C. Após o período de equilíbrio, as palhetas permaneceram a 6 cm de distância do nitrogênio líquido em temperatura de -80°C a -120°C por 20 minutos. Finalmente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido e armazenadas para posterior avaliação e utilização.

A funcionalidade (fecundação *in vivo*) dos espermatozoides do grupo G24 (grupo que sofreu por menos tempo o efeito da refrigeração) e do grupo G72

(grupo que sofreu por mais tempo o efeito da refrigeração) foi testada por meio de inseminação artificial. Para atingir este objetivo, quatro palhetas de cada grupo foram descongeladas e misturadas para minimizar o efeito individual. O conteúdo das palhetas foi misturado e centrifugado a 200xg por 2 min e o *pellet* de espermatozoides foi ressuspenso com 0,5mL de Tris-gema sem glicerol, compondo uma dose inseminante com 60×10^6 espermatozoides totais e aproximadamente 29×10^6 e 12×10^6 espermatozoides móveis, para os Grupos G24 e G72, respectivamente. Dez fêmeas adultas manifestando cio natural foram inseminadas no corpo do útero após 12 horas do início do estro. Cinco fêmeas foram inseminadas com os espermatozoides do grupo G24 e outras cinco fêmeas inseminadas com espermatozoides do grupo G72. Após 45 dias, as fêmeas foram avaliadas por ultra-sonografia determinando a ocorrência de gestações. Aproximadamente 280 dias após a inseminação artificial, foi observado o nascimento dos animais.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Sigma Stat 3.11 (Systat Software, Inc., Richmond, California, USA). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo de Tukey. Uma diferença de $P < 0,05$ foi considerada significante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração espermática média por epidídimo foi de $380 \pm 55 \times 10^6$ espermatozoides mL^{-1} . Em um procedimento de congelação deste material, considerando uma concentração de 15 milhões de espermatozoides por palheta, a concentração verificada seria suficiente para compor aproximadamente 25 doses inseminantes por epidídimo.

Os resultados de avaliação morfológica dos espermatozoides recuperados do epidídimo após o período de refrigeração (sendo considerados todos os grupos) estão demonstrados na figura 1. Em todas as amostras, a alteração de cauda foi o principal defeito encontrado, seguido por defeitos na peça intermediária, sendo a gota protoplasmática distal (17,5%) a principal anormalidade (Figura 1). Estas alterações são atribuídas à imaturidade do material recuperado diretamente do epidídimo.

Houve um decréscimo significativo na motilidade espermática somente após 72 horas de refrigeração. Consequentemente, a motilidade pós-congelação foi reduzida significativamente no tratamento G72, no qual os espermatozoides foram refrigerados por 72 horas e a motilidade já havia sido comprometida (Tabela 1). O declínio da motilidade espermática de acordo com o aumento do tempo de

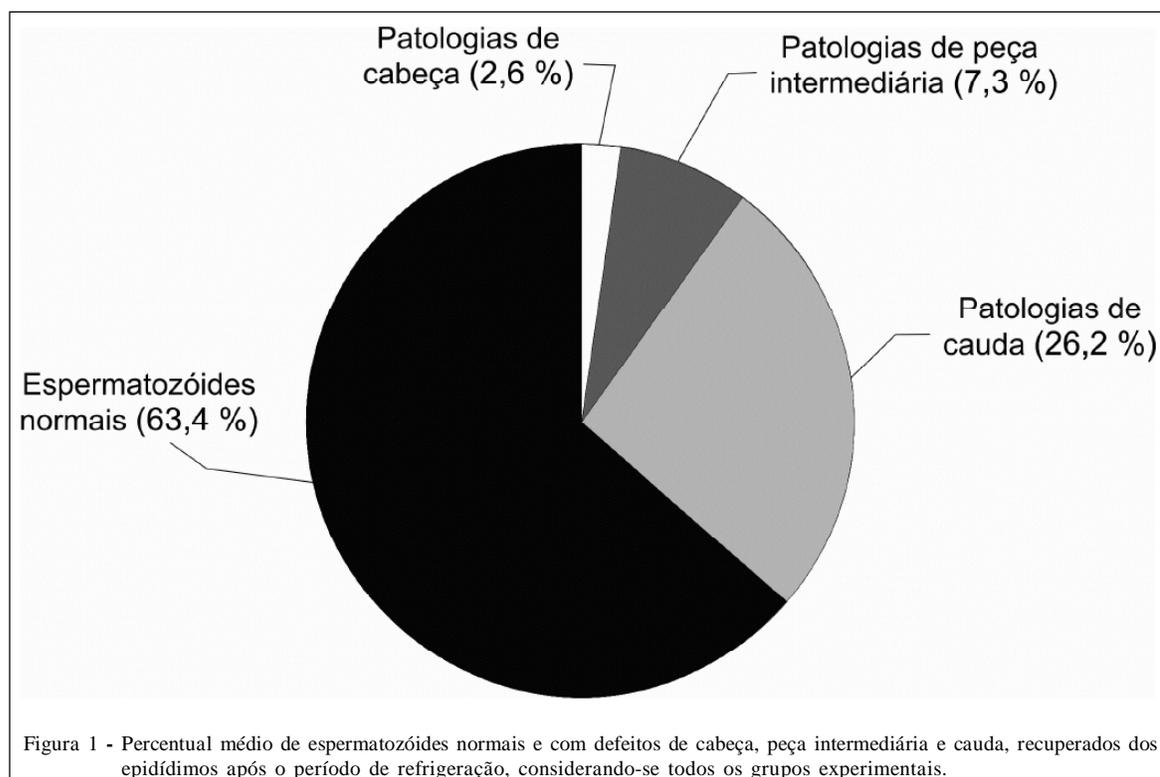


Tabela 1 - Valores médios (\pm desvio padrão) de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática e acrossoma de espermatozóides oriundos de epidídimos resfriados por 0 (G0), 24 (G24), 48 (G48) e 72 horas (G72), pré e pós-criopreservação.

Tratamento	-----Pré-criopreservação-----			-----Pós-criopreservação-----		
	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Integridade de membrana plasmática e acrossoma (%)	Motilidade (%)	Vigor (0-5)	Integridade de membrana plasmática e acrossoma (%)
G 0	77,80 \pm 11,36 ^{aA}	3,1 \pm 0,3 ^{aA}	75,50 \pm 8,02 ^{aA}	52,00 \pm 13,03 ^{aB}	2,7 \pm 0,7 ^{aA}	64,00 \pm 10,53 ^{aA}
G 24	65,0 \pm 9,74 ^{aA}	3,0 \pm 0,5 ^{aA}	72,12 \pm 25,20 ^{aA}	49,00 \pm 10,0 ^{aB}	2,8 \pm 0,5 ^{aA}	50,30 \pm 30,46 ^{aA}
G48	60,0 \pm 14,14 ^{aA}	3,0 \pm 0,6 ^{aA}	70,71 \pm 22,98 ^{aA}	34,00 \pm 15,16 ^{aB}	2,6 \pm 0,6 ^{aA}	45,60 \pm 17,06 ^{aB}
G 72	50,0 \pm 11,40 ^{bA}	2,7 \pm 0,2 ^{aA}	64,00 \pm 24,62 ^{aA}	20,0 \pm 14,83 ^{bB}	2,5 \pm 0,3 ^{aA}	49,40 \pm 28,19 ^{aB}

Nas linhas, os valores sobrescritos por letras maiúsculas diferentes (A \neq B) indicam diferenças estatísticas para o mesmo parâmetro (P<0,05). Nas colunas, os valores sobrescritos por letras minúsculas diferentes (a \neq b) indicam diferenças estatísticas para o mesmo parâmetro (P<0,05).

armazenamento no epidídimo após a morte tem sido demonstrado em várias pesquisas com diferentes espécies (FERNÁNDEZ-SANTOS et al., 2009, MARTINEZ-PASTOR et al., 2005, KAABI et al., 2003). Em seu estudo com *Capra pyrenaica* hispânica, SANTIAGO-MORENO et al. (2007) constataram que a queda na qualidade dos espermatozóides está primariamente correlacionada com a queda da motilidade, sendo este o principal parâmetro afetado.

Em todos os grupos, a motilidade pós-congelamento apresentou uma redução significativa em comparação com os tratamentos de refrigeração (Tabela 1). O vigor espermático não foi afetado nem pela refrigeração e nem após a criopreservação (Tabela 1). KAABI et al. (2003) e FERNÁNDEZ-SANTOS et al. (2009) demonstraram uma redução no vigor após 48 horas de refrigeração do epidídimo em carneiros e acima de 192 horas em cervos.

A integridade de membrana plasmática e acrossoma também não foram afetadas pela refrigeração em todos os grupos, porém os grupos G48 e G72 pós-criopreservação apresentaram danos significativos nessas estruturas, quando comparados aos espermatozóides dos respectivos grupos de refrigeração (Tabela 1). GAÑÁN et al. (2009) encontraram em gatos domésticos uma diminuição significativa na integridade acrossomal entre o momento da coleta e após a congelamento dos espermatozóides, quando os epidídimos foram resfriados por 48 horas e 72 horas. Ainda verificaram significativa correlação entre a porcentagem de acrossomas íntegros e a porcentagem de espermatozóides móveis quando os epidídimos são refrigerados por 24, 48 e 72 horas a 5°C. Esses resultados encontrados em vários trabalhos com diferentes espécies indicam que o processo de criopreservação é danoso aos espermatozóides, especialmente para os grupos resfriados por mais de 48 horas.

Considerando os defeitos espermáticos presentes nas amostras, a queda na motilidade e os danos de membrana plasmática e acrossoma, a capacidade de fecundação dos espermatozóides pós-criopreservação neste experimento foi suficiente para promover duas gestações e dois nascimentos de bezeros saudáveis (2:10, 20% de sucesso), sendo um bezero proveniente do tratamento G 24 e o outro do grupo G 72. Esses animais nascidos na Embrapa Cerrados conferem o primeiro registro de bezeros nascidos a partir de inseminação artificial utilizando espermatozóides do epidídimo recuperados três dias após a morte do reprodutor. Apesar do pequeno número de fêmeas inseminadas, o sucesso determinado pelo nascimento dos animais torna esta metodologia uma ferramenta importante para conservação de espermatozóides de animais em risco de extinção.

Como verificado neste estudo, os espermatozóides podem sobreviver por vários dias no epidídimo de animais mortos, porém, segundo SONGSASEN et al. (1998), a diminuição da viabilidade espermática acompanha as mudanças de decomposição da carcaça e aumenta com o avanço do tempo após a morte. Em países continentais, como o Brasil, quando animais geneticamente importantes morrem, na maioria das vezes, não há técnicos capacitados e ou equipamentos disponíveis para recuperar e criopreservar o germoplasma rapidamente (MARTINS et al., 2009). Nessas situações, a refrigeração dos epidídimos a 5°C é uma importante estratégia, pois prolonga a sobrevivência dos espermatozóides nesta estrutura e permite um tempo extra para a recuperação e processamento dos espermatozóides. De acordo com ROLDAN & GOMENDIO (2009), espermatozóides recuperados do epidídimo podem compor um banco de germoplasma como uma reserva de diversidade genética de várias espécies e ser utilizado posteriormente por técnicas da reprodução. A

abordagem de se recuperar espermatozoides do epidídimo de animais mortos se constitui em mais uma oportunidade para que reprodutores valiosos deixem descendentes e preservem genes importantes para uma população. Dessa forma, esta metodologia é uma importante ferramenta que pode ser utilizada na conservação da biodiversidade de animais domésticos e silvestres e ainda evitar a perda de material genético de animais com importância econômica.

CONCLUSÃO

É possível concluir que epidídimos de bovinos que morrem subitamente podem ser refrigerados por até 72 horas sem perdas funcionais relevantes e, assim, garantir a viabilidade dos espermatozoides para criopreservação e utilização em técnicas de reprodução animal. Além disso, a viabilidade dos espermatozoides após a criopreservação foi avaliada *in vivo* por inseminação artificial, obtendo-se o nascimento de bezerros normais quando os epidídimos foram refrigerados por até 72 horas.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária e ao Centro Universitário de Brasília (UnICEUB), pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- DIDION, B.A. et al. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of various species. **Gamet Research**, v.22, n.1, p.51-57, 1989. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/109927224/PDFSTART>>. Acesso em: fev. 2010. doi:10.1002/mrd.1120220106.
- FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R. et al. Effects of long-term chilled storage of red deer epididymides on DNA integrity and motility of thawed spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.111, n.1, p.93-104, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6T43-4R5YC8N-1-5&_cdi=4963&_user=7430124&_pii=S0378432008000407&_orig=search&_coverDate=03%2F31%2F2009&_sk=998889998&view=c&wchp=dGLbVzWzSkzV&md5=649d4810938bdcf3d33a206c2491f91&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: abr. 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.02.001.
- GAÑÁN, N. et al. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5°C on sperm quality and cryopreservation. **Theriogenology**, v.72, n.9, p.1268-1277, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6TCM-4X8YMCH-4&_cdi=5174&_user=7430124&_pii=S0093691X09003689&_orig=search&_coverDate=12%2F31%2F2009&_sk=999279990&view=c&wchp=dGLbVWzSkz&md5=3f1fa758c3d92e85dd69f1ce127d730&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: mar. 2010. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.07.023.
- KAABI, M. et al. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v.60, n.7, p.1249-1259, 2003. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6TCM-48NXDNY-4-D&_cdi=5174&_user=7430124&_pii=S0093691X03001390&_orig=search&_coverDate=10%2F15%2F2003&_sk=999399992&view=c&wchp=dGLbVzSkzWA&md5=5d21f20482f5530f48387b5860d77cfl&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: mar. 2010. doi:10.1016/S0093-691X(03)00139-0.
- MARTINS, C.F. et al. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. **Animal Reproduction Science**, v.101, n.3, p.326-331, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6T43-4N02J4Y-2-1&_cdi=4963&_user=7430124&_pii=S0378432007000383&_orig=search&_coverDate=10%2F31%2F2007&_sk=998989996&view=c&wchp=dGLbVzSkzWb&md5=509cc4c5542fca1cdf4abd1997e5c71&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: fev. 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2007.01.018.
- MARTINS, C.F. et al. Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. **Animal Reproduction Science**, v.116, n.1, p.50-57, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6T43-4V8GB4N-3-1&_cdi=4963&_user=7430124&_pii=S03784320080005186&_orig=search&_coverDate=11%2F30%2F2009&_sk=998839998&view=c&wchp=dGLbVzSkzV&md5=0a289e8de93e45c4207866e96b6ebc32&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: abr. 2010. doi:10.1016/j.anireprosci.2008.12.018.
- MARTINEZ-PASTOR, F. et al. Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. **Theriogenology**, v.60, n.1, p.24-40, 2005. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6TCM-4CJVK7J-1-1&_cdi=5174&_user=7430124&_pii=S0093691X04001037&_orig=search&_coverDate=01%2F01%2F2005&_sk=999369998&view=c&wchp=dGLbVtbzSkzWb&md5=b19b5c70d43766770c66be2c520de36b&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: fev. 2010. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.03.003.
- PARRISH, J.J. et al. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v.44, n.6, p.859-869, 1995. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIImg&_imagekey=B6TCM-3YS920B-1K-1&_cdi=5174&_user=7430124&_pii=0093691X95002719&_orig=search&_coverDate=10%2F15%2F1995&_sk=999559993&view=c&wchp=dGLbVtbzSkzV&md5=70faab390fce128afc182188b7319d97&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: jan. 2010. doi:10.1016/0093-691X(95)00271-9.
- ROLDAN, E.R.S.; GOMENDIO, M. Sperm and conservation. In: BIRKHEAD, T.R. et al. (Ed.). **Sperm biology**. San Diego: Academic, 2009. p. 539-564.
- SONGSASEN, N. et al. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. **Journal of Experimental Zoology**, v.280, n.2, p.189-196, 1998. Disponível em: <<http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/31628/PDFSTART>>. Acesso em: mar. 2010. doi:10.1002/

(SICI)1097-010X(19980201)280:2<189::AID-JEZ10>3.0.CO;2-H.

SANTIAGO-MORENO, J. et al. Horn quality and postmortem sperm parameters in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*). **Animal Reproduction Science**, v.99, n.3, p.354-362, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6T43-4KF6BP6-2-5&_cdi=4963&_user=7430124&_pii=S0378432006002909&_orig=search&_coverDate=06%2F30%2F2007&_sk=999009996&view=c&wchp=dGLbVtbzSkWb&md5=1b50110193bab7db935e29b48bbff6f&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: abr. 2010. doi: 10.1016/j.anireprosci.2006.06.004.

TITTARELLI, C. et al. Effect of storage media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. **Theriogenology**, v.66, n.6, p.1637-40,

2006. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TCM-4J7H40N-2-1&_cdi=5174&_user=7430124&_pii=S0093691X06000367&_orig=search&_coverDate=10%2F31%2F2006&_sk=999339993&view=c&wchp=dGLbVtzzSkzV&md5=b4adc1e5e9b505388827d4cff2c0b4b6&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: abr. 2010. Acesso em: jan. 2010. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.01.021.

YU, I.; LEIBO, S.P. 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. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=MIimg&_imagekey=B6TCM-4G002DH-1-1&_cdi=5174&_user=7430124&_pii=S0093691X05001056&_orig=search&_coverDate=10%2F15%2F2005&_sk=999359992&view=c&wchp=dGLzVlzzSkzS&md5=b3ced2e08a0c74bf312dd8bc93f4e38a&ie=/sdarticle.pdf>. Acesso em: mar. 2010. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.03.013.