

CONGELAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATOS UTILIZANDO O DILUIDOR BOTU-CRIO® APÓS REFRIGERAÇÃO POR 24 h EM CONTÊINER DE TRANSPORTE DE SÊMEN BOTU-TAINER®

[*Cryopreservation of feline epididymal sperm using Botu-crio® extender after cooling for 24h in Botu-tainer® semen transportation container*]

Beatrice Ingrid Macente^{1*}, Cleber Fernando Menegasso Mansano², Marcelo Maia Pereira², Maria Isabel Mello Martins³, Marilu Martins Gioso⁴, Paula Andressa Pennacchi Savi¹, Raquel Ribeiro Gutierrez¹

¹Universidade Estadual Paulista, Faculdade Ciências Agrárias e Veterinárias, Departamento de Obstetrícia e Reprodução Animal, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

²Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Pós-Graduação, São Paulo, Brasil.

³Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil.

⁴Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas, Minas Gerais, Brasil

RESUMO - As possibilidades de uso de espermatozoides obtidos do epidídimo vêm sendo amplamente utilizadas devido à permanência da capacidade espermática fecundante e possibilidade de uso para felídeos selvagens. Porém, no processo de criopreservação, alguns estudos demonstram perdas na qualidade dos espermatozoides quando deixados sob refrigeração antes da congelação por tempos determinados. O presente trabalho teve por objetivo, avaliar a qualidade dos espermatozoides obtidos de epidídimos de gatos domésticos, após a criopreservação utilizando um meio diluente a base de gema de ovo com glicerol (Botu-crio®), comparando as características morfofuncionais, após refrigeração por 24 horas em container de transporte de sêmen (Botu-tainer®). Foram utilizados oito gatos domésticos submetidos à orquiectomia eletiva, com idades a partir de oito meses, sem determinação racial e em bom estado nutricional (2,5 – 5,5kg ou 4kg em média). As características espermáticas avaliadas foram: motilidade, vigor, concentração, integridade de membrana e morfologia espermática. Verificou-se que, após avaliações estatísticas, o container de transporte de sêmen foi capaz de manter a viabilidade espermática, mesmo após as 24h. Observou-se também uma queda significativa de todos os parâmetros pós-congelação, consequentes, provavelmente, ao estresse térmico que ocorre no processamento. No entanto, a porcentagem de integridade de membrana pós-descongelação demonstra boa empregabilidade do diluente Botu-crio®, com possível viabilidade *in vitro* para realização de fertilizações, necessitando de maiores avaliações.

Palavras-Chave: espermatozoides epididimários; felinos; congelação.

ABSTRACT - The possibilities of using the sperm collected from the epididymis have been widely used because the fertilizing capacity sperm preservation and the possibility of using it for wild cats. But in the process of cryopreservation, some studies show a decrease in the quality of the sperm when left under cooling before frozen for some time. This study aimed to assess the quality of the epididymal sperm obtained from domestic cats after cryopreservation using a diluent based on egg yolk and glycerol (Botu-crio®), comparing the morphofunctional characteristics after cooling for 24 hours in a container of semen transport (Botu-tainer®). We use eight cats submitted to elective orchietomy, aging from eight months, without racial determination, and good nutritional status. These sperm characteristics were: motility, vigor, concentration, membrane integrity and morphology. It has been found, after statistical analysis, that the container of semen was able to maintain sperm viability, even for 24h. We also observed a significant decrease on all parameters after frozen, consequential, probably to thermal stress that occurs in processing. However, the percentage of membrane integrity after thawing shows good employability of the Botu-crio®, which viability is possible to perform *in vitro* fertilization, requiring higher ratings.

Keywords: epididymal sperm; feline; freezing.

* Autor para correspondência: beatrice.vetuel@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

As pesquisas com o gato doméstico são muito úteis, visto que este serve como modelo experimental para felinos selvagens ameaçados de extinção e para estudos de patologias humanas (Farstad, 2000). Entretanto, cresce cada vez mais a demanda de reprodução assistida entre os criadores de felinos domésticos devido à pequena variação genética entre as raças existentes hoje no mercado, sendo que a utilização de sêmen criopreservado na reprodução assistida pode melhorar o potencial dos animais domésticos e principalmente dos animais selvagens (Zambelli et al., 2010).

A técnica de recuperação de espermatozoides de epidídimos de gatos que passaram por esterilização cirúrgica ou que vieram a óbito é de suma importância para avanços nas pesquisas de preservação de germoplasma, principalmente para felídeos selvagens (Platz et al., 1978; Tsutsui et al., 2000). Neste sentido, alguns estudos demonstraram que, na recuperação espermática de epidídimos na espécie felina, os testículos podem ser mantidos em temperatura ambiente por até 5 horas, sem grande perda da motilidade espermática (Schäfer & Holzmann, 2000); ou *overnight*, sob refrigeração a 5°C (Goodrowe & Hay, 1993).

Em pesquisas com espermatozoides recuperados de epidídimos de gatos, avaliou-se que eles apresentam características como motilidade espermática e porcentagem de células normais de aproximadamente 50%. Constatou-se também que espermatozoides provenientes do epidídimo possuem a habilidade para capacitação e realização dos primeiros estágios de fertilização com oócitos de hamster sem zona pelúcida (Goodrowe & Hay, 1993).

Associado à recuperação dos espermatozoides diretamente do epidídimo, estão os processos de criopreservação dos mesmos. Estes são imprescindíveis, pois possibilitam a troca de material genético entre localidades distantes ou o simples armazenamento por períodos indefinidos, uma vez que, nem sempre o sêmen de interesse pode ser utilizado de imediato. A preservação por crioprocessamento visa garantir a viabilidade do gameta masculino em fertilizar o gameta feminino após sua descongelamento (Silva, 2007). Para realizar o transporte de espermatozoides, dois métodos podem ser utilizados, a refrigeração a 4 e 5 °C e a congelamento à -196 °C, pois as baixas temperaturas reduzem o seu metabolismo, prolongando sua longevidade.

Segundo Gunzel-Apel e Krause (1986), o sêmen pode manter sua fertilidade quando refrigerado por até 72h. Entretanto, outros autores afirmam que, quando corretamente diluído e refrigerado, os espermatozoides podem manter-se adequados por até cinco dias (Feldman & Nelson, 1996). Logo, a refrigeração do sêmen durante 24 a 48 horas, pode ser um método empregado antes da congelamento, quando não há a possibilidade de congelamento logo após a colheita. À exemplo, Hermansson e Lind-Forsberg (2006) congelaram o sêmen de cão, após um ou dois dias de refrigeração a 4 °C e nenhuma diferença significativa foi observada na motilidade e integridade de membrana, quando comparados àqueles submetidos a congelamento logo após colheita.

Para refrigeração e possível transporte, existem os sistemas de resfriamento passivos (ex: caixas térmicas de isopor ou containers) e ativos (ex: refrigeradores domésticos). Os primeiros possuem menor custo, porém com eficiência relativa, dependendo de alguns fatores como a temperatura ambiente e da massa da amostra. Já os segundos sistemas, permitem melhores taxas de resfriamento, pois a temperatura é pré-estabelecida, apesar de serem mais caros (Valle, 1999).

Não existe um container de transporte de sêmen específico para felinos. Neste presente trabalho, optou-se pela utilização do container para transporte de sêmen Botu-tainer® (Biotech, Botucatu, Brasil), muito empregado para bovinos e equinos. Segundo o fabricante, é um container desenvolvido para refrigeração de sêmen, demonstrando alta eficiência na manutenção da temperatura, mesmo sobre estresse calórico ambiental. Sua taxa de refrigeração é de 0,05 °C/min, mantendo a temperatura de 5 °C por até 35 h.

A refrigeração e a congelamento do sêmen só é eficaz, com o uso de meios diluentes, capazes de preservar sua integridade. Estes diluentes são capazes de proteger a membrana espermática dos danos causados pela modificação de temperatura (Bouchard et al., 1990). Também são fonte de energia, tamponamento e proteção a contaminantes como bactérias e fungos por meio de antibióticos e antifúngicos (Lardy & Philips, 1939; Marshal & Hugh, 1990; Rota et al., 1995). Segundo Lopes et al., (2005), a melhor maneira de avaliar o diluente é por meio da taxa de concepção das fêmeas após a inseminação artificial, porém este é um procedimento inviável na experimentação.

A adição de diluentes para congelamento de sêmen melhorou a qualidade após o descongelamento, para espécies como: javalis (Pursel et al., 1978),

garanhões (Martin et al., 1979), bois (Arriola & Foote, 1987), ratos (Pendolf & Moore, 1993) e cães (Rota et al., 1997). Já no gato doméstico, Tsutsui et al. (2003) verificaram que a qualidade do espermatozóide coletado do epidídimo e posteriormente congelado com diluente foi ligeiramente melhor do que a dos congelados sem diluente.

O meio diluente Botu-crio[®] (Botupharma, Botucatu/SP, Brasil) foi elaborado com a intenção de uso em eqüinos (Melo et al., 2008), sendo já comprovada sua eficácia. Por se tratar de um produto comercial nacional, pode reduzir os custos do procedimento. A sua eficácia pode ser devido à associação em sua formulação de dois crioprotetores intracelulares, o glicerol e a amida, com um extracelular, a gema de ovo, reduzindo o estresse osmótico (Ball & Vo, 2001) e prevenindo a formação de cristais de gelo intracelular (Amann & Pickett, 1987).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a qualidade e viabilidade dos espermatozoides obtidos de epidídimo de gatos domésticos, após a criopreservação com adição de um diluente comercial nacional (Botu-crio[®]) à base de gema de ovo associado ao glicerol e uma amida, comparando as características morfofuncionais antes e após a congelação, tendo passado por um período de refrigeração de 24 horas em container de transporte de sêmen (Botu-tainer[®]), para a reprodução assistida e modelo experimental para práticas reprodutivas com felídeos selvagens.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados testículos de oito gatos, submetidos à orquiectomia eletiva, com idades a partir de oito meses, sem determinação racial e em bom estado nutricional (2,5 – 5,5 kg ou 4 kg em média). Durante o procedimento cirúrgico, após a excisão dos testículos, foram realizadas ligaduras nos ductos deferentes para impedir a saída dos espermatozoides durante o transporte. Esses órgãos foram acondicionados em solução fisiológica 0,9% a temperatura ambiente e transportados ao laboratório.

Após prévia dissecação das estruturas testiculares, a cauda do epidídimo e parte do ducto deferente foram comprimidos com o auxílio de pinças hemostáticas, depositando o conteúdo obtido em uma placa de Petri contendo 100 µL de Botu-crio[®]. Uma pequena amostra deste material coletado foi colocada entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37°C, para avaliação subjetiva, ao microscópio óptico (aumento de 10x e 40x), da motilidade (porcentagem de

células móveis variando entre: 0 a 100%) e vigor espermático (qualidade do movimento progressivo dos espermatozoides em escala de 0 a 5). Também foram determinadas as concentrações espermáticas pela diluição do sêmen recuperado em 1:10 de água destilada e leitura em Câmara de Neubauer, por meio de microscópio óptico com objetivas de 10 e 40x.

A avaliação do percentual de vivos e mortos foi realizada por esfregaços de sêmen com o corante eosina/ nigrosina e leitura de 100 células em microscópio óptico com objetiva de 100x. Para averiguar a morfologia espermática, foram realizados esfregaços do sêmen e coloração com o corante POPE (Jesus et al., 2008). A leitura desses foi feita com microscópio óptico com objetiva de 100x. Avaliou-se 200 células espermáticas e as alterações morfológicas classificadas em defeitos maiores e menores.

Em seguida, as amostras contendo os espermatozoides foram centrifugadas, em 800 g por 10 minutos. O sobrenadante desprezado e o *pellet* ressuspendido em meio diluente nacional Botu-crio[®] numa concentração de 100x10⁶ espermatozoides/mL. As amostras foram submetidas à refrigeração em um container de transporte de sêmen Botu-tainer[®] (Biotech, Botucatu, SP, Brasil), a qual preserva a temperatura em torno de 5 °C, por 24 h. Após este período, as amostras foram diluídas em 1:1 em Botu-crio[®] e envazadas em palhetas de 0,5 ml, lacradas com álcool polivinílico e levadas à refrigeração a 5 °C, por um período de 60 min. Tanto as palhetas como o meio diluente foram previamente mantidos junto com as amostras, no container, para evitar choque térmico.

A congelação das palhetas foi feita em vapor de nitrogênio, em uma grade de metal posicionada a 6,0 cm da coluna do nitrogênio líquido, em uma caixa isotérmica de 38 x 15 x 24 cm durante 20 minutos. Imediatamente após, as palhetas foram mergulhadas no nitrogênio líquido e posteriormente armazenadas em botijão criogênico.

A descongelação das palhetas foi realizada em banho-maria a 70°C durante 8 segundos. As amostras foram mantidas em tubos plásticos de 1,5 ml em temperatura ambiente durante as análises pós-descongelação. Novamente foram avaliadas as características morfofuncionais pelos mesmos procedimentos realizados anteriormente.

Os resultados foram digitados em planilhas eletrônicas e submetidos ao programa SAEG (2007) para as avaliações de homogeneidade e normalidade. Posteriormente os dados foram avaliados para

análise de variância (ANOVA) e caso significativos, submetidos ao teste de Duncan com 5% de probabilidade. A variável vigor foi submetida à análise não paramétrica de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nas averiguações de morfologia espermática; avaliações subjetivas da motilidade, vigor e percentual de vivos, dos oito gatos selecionados e nos três momentos de interesse da pesquisa: fresco, após 24h de refrigeração com diluente Botu-crio[®] e após congelação em nitrogênio líquido mostraram diferença para alguns parâmetros (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados de motilidade, vigor, defeitos maiores, menores, células normais e vivas (média ± desvio padrão) em espermatozoides epididimários de felino (n = 8) a fresco, pós-refrigerado e descongelado.

Espermatozoides Epididimários	Mot*	Vig*	DEFM	DEFN*	NORM	VIV*
A fresco	72,5±13,6 ^a	4,1±0,6 ^a	82,6±36,4	77,5±33,2 ^a	62,8±64,3	85,0±13,7 ^a
Pós-refrigerado	67,5±13,1 ^a	3,7±0,5 ^a	75,1±31,7	62,7±45,3 ^a	62,1±43,3	89,6±5,9 ^a
Descongelado	23,7±13,8 ^b	2,4±1,1 ^b	85,6±43,3	24,5±15,2 ^b	89,8±52,9	47,1±15,8 ^b

*Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade (P<0,05).

Mot. = motilidade; Vig = vigor; DEFM = defeitos maiores; DEFN = defeitos menores; NORM = células normais; VIV= células vivas.

Para que se obtenha êxito na congelação de sêmen, é necessário que ele seja apropriadamente diluído, e assim quando reaquecido continue potencialmente fecundante (Luvoni et al., 2003). Desta forma, busca-se um diluente que possua uma reserva de energia para nutrição do espermatozóide; tenha a capacidade de tamponamento; preserve os padrões fisiológicos de pressão osmótica e concentração de eletrólitos; e preserve a célula durante o processo de resfriamento (Concannon & Battista, 1989). Ele deve conter crioprotetores, pois melhoram a sobrevivência celular, durante as sequências de congelação e descongelação, pois minimizam as alterações na membrana. Atualmente, o diluente Botu-crio[®] tem apresentado boas vantagens, quanto às propriedades citadas, sendo muito empregado em diferentes grupos de pesquisa (Terraciano et al., 2008).

A baixa motilidade e vigor espermático observados no sêmen descongelado no presente trabalho podem ter sido relacionados à imaturidade, como descrito por Santos e Vannuchi (2002) para espermatozoides epididimários. Apesar de uma diminuição significativa na motilidade espermática após a descongelação, a quantidade de células íntegras e morfologicamente normais foi muito próxima dos

Segundo Tebet et al. (2006) em gatos domésticos verificou-se uma quantidade pequena de espermatozoides com anormalidades de cabeça, acrossoma e de peça intermediária durante o trânsito epididimário, ao contrário das outras espécies. Também, segundo os mesmos autores, observa-se um decréscimo na proporção de espermatozoides com anormalidades de cauda, provavelmente ocasionado pela osmolaridade do conteúdo seminal durante a ejaculação.

resultados obtidos da descongelação de espermatozoides provenientes de ejaculados (Martins et al., 2006).

Verificou-se uma queda significativa (p<0,05) na qualidade dos parâmetros avaliados pós-refrigeração e pós-congelação, resultados estes já esperados devido ao estresse térmico a que os espermatozoides são submetidos durante o processo de congelação. Contudo, estes resultados estão de acordo com os obtidos por Tebet et al (2006), nos quais observou-se vários defeitos no sêmen descongelado, que segundo esses autores, comprometeriam a habilidade na fertilização.

A criopreservação de espermatozoides provoca grandes danos químicos e físicos às membranas celulares, atribuídos às alterações na transição da fase lipídica e no aumento a peroxidação (Purdy, 2006). Considera-se que os processos de congelação e descongelação resultam em uma possível diminuição na quantidade de espermatozoides viáveis, na velocidade e na capacidade fertilizante (Isachenko et al., 2004). Neste estudo verificou-se que, apesar da queda significativa (p<0,05) na qualidade espermática após a descongelação das amostras, em relação à avaliação a fresco e depois de

refrigerada, não houve uma queda significativa da qualidade espermática após a refrigeração, o que demonstra que a manutenção dessas amostras no container Botutainer® por 24 horas, não foi prejudicial, viabilizando o transporte ou apenas a conservação até a realização das práticas de reprodução assistida. Porém, mais estudos são necessários para a determinação do período máximo de conservação do sêmen em caixas isotérmicas. Estes estudos poderão contribuir para determinação de uma caixa e meios diluentes ideais para refrigeração de sêmen para determinadas espécies, como o canino, ou modelos para espécies ameaçadas de extinção como os felinos selvagens (Lopes et al., 2005). Já a baixa taxa de motilidade (23,7%) obtido após a descongelação, foi compensada por uma boa percentagem de integridade de membrana (47,1%) para o mesmo momento, indicando que mesmo após os processos de refrigeração e congelamento, os espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo mantiveram qualidade *in vitro* compatível com a realização de fertilizações.

CONCLUSÃO

A boa recuperação deve-se, em grande parte, a boa atuação do diluente Botu-crio®. Conclui-se que a associação da diluição de sêmen de gatos em Botu-crio® com a refrigeração por 24h no Botu-tainer® seguida da congelamento permitiu obtenção de qualidade seminal aceitável para futuros testes de fertilizações *in vitro* utilizados na reprodução assistida. Avaliações de outros parâmetros seminais e testes *in vivo* ainda se fazem necessários.

REFERÊNCIAS

- Amann, R.P. & Pickett, B.W. 1987. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. *Equine Veterinary Science*, 7: 143-73.
- Arriola, J. & Foote R.H. 1987. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. *Journal of Dairy Sciences*, 70: 1664-1670.
- Ball, B.A. & Vo, A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *Journal of Andrology*, 22(6):1061-1069.
- Bouchard, G.F., Morris, J.K., Sikes, J.D. & Youngquist, R.S. 1990. Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoa motility. *Theriogenology*, 34: 147-157.
- Concannon, P.W. & Battista, M. 1989. Canine semen freezing and artificial insemination. In: Kirk RW. (Ed.). *Current veterinary therapy*. Philadelphia: WB Saunders. p.1247-1259.
- Farstad, W. 2000. Current state in biotechnology in canine and feline reproduction. *Animal Reproduction Science*, 60: 375-387.
- Goodrowe, K.L. & Hay, M. 1993. Characteristics and zona binding ability of fresh and cooled domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, 40: 967-975.
- Günzel, A.R. & Krause, D. 1986. Läufigkeitsüberwachung und Samenübertragung beim Hund. *Tierärztliche Umschläge Hannover, Alemanha*, 8: 566-570.
- Hermansson, U & Linde-Forsberg, C. 2006. Freezing of stored, chilled dog spermatozoa. *Theriogenology*. 65:584-593
- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Rahimi, G., Schondorf, T., Mallmann, P., Dessole, S. & Nawroth, F. 2004. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Human Reproduction*, 19:932-939.
- Jesus, A.T., Savi, P.A.P. & Martins, M.I.M. 2008. Comparação de diferentes colorações na avaliação morfológica de espermatozoides de epidídimo de cães e gatos. In: Anais do XVI EAIC, 2008, Londrina, PR. 1 CD-ROM.
- Lardy, H. A. & Phillips, P. H. 1939. Preservation of spermatozoa. In: Proceedings of the 32nd Annual Meeting of the American Society on Animal Production, p.219-221.
- Lopes, B. V., Cunha, I. C. N., Papa, F. O. & Detmann, E. 2005. Estudo da viabilidade de um novo diluidor para a refrigeração do sêmen canino. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 29:174-178.
- Luvoni, G.C., Kalchschmidt, E., Leoni, S. & Ruggiero, C. 2003. Conservation of feline semen Part I: Cooling and freezing protocols. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 5: 203-208.
- Marshall, F. & Hugh, A. 1990. *Reproduction in the male in Marshall's physiology of reproduction*. New York. Churchill Livingstone. p.769-775.
- Martin, J.C., Klug, E. & Gunzel A.R. 1979. Centrifugation of stallion semen and its storage in large volume straws. *Journal of Reproduction and Fertility*, 27:47-51.
- 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. & Alvarenga, M.A. 2008. Como colher e congelar sêmen de epidídimo de reprodutores terminais ou mortos. In: Anais da 9^a Conferência Anual da ABRAVEQ, 2008, São Paulo. Anais..., São Paulo: ABRAVEQ.
- Feldman E.C. & Nelson, R.W. Feline reproduction. In: Feldman EC, Nelson RW eds. *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. 1996. Philadelphia: WB Saunders Co, 741-768.
- Pendolf, L.M. & Moore, H.D. 1993. A new method for cryopreservation of mouse spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 99: 131-134.
- Platz, C.C., Wildt, D.E. & Seager, S.W. 1978. Pregnancy in the domestic cat after artificial insemination with previously frozen spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, 52:279-282.
- Purdy, P.H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research*, 63: 215-225.

- Pursel, V.G., Schulman, L.L. & Johnson, L.A. 1978. Effect of Orvus ES Paste on acrosome morphology, motility and fertilizing capacity of frozen-thawed boar sperm. *Journal of Animal Science*, 47: 198-202.
- Rota, A., Ström, B. & Linde-Forsberg, C. 1995. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4°C. *Theriogenology*, 44: 885-900.
- Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C. & Rodriguez-Martinez, H. 1997. Effects of Equex STM Paste on viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*, 47:1093-1101.
- SAEG. *Sistema para Análises Estatísticas*. 2007. Versão 9.1: Fundação Arthur Bernardes - UFV - Viçosa.
- Santos, S.E.C. & Vannucchi, C.I. 2002. Criopreservação de espermatozoides epididimários em cães *pós-mortem*. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 26:129-276.
- Schäfer S. & Holzmann, A. 2000. The use of transmigrator and Spermactm stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 59: 201-11.
- Silva A.R. 2007. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 31: 119-127.
- Tebet, J.M., Martins, M.I., Chirinea, V.H., Souza, F.F., Campagnol, D. & Lopes, M.D. 2006. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, 66: 1629-1632.
- Terraciano, P.B., Bustamante-Filho, I.C., Miquelito, L.V., Arlas, T.R., Castro, F., Mattos, R.C., Passos, E.P., Oberst, E.R. & Lima, E.O.C. 2008. Criopreservação de espermatozoides equinos comparando duas curvas de congelamento combinadas com diluentes comerciais: uma análise laboratorial. *Ciência Rural*, 38(7):1972-1977.
- Tsutsui, T., Tanaka, A., Takagi, Y., Nakagawa, K., Fujimoto, Y. & Murai, M. 2000. Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62:1241-1245.
- 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.
- Valle, G. R. 2009. Utilização de sêmen refrigerado e do sêmen congelado em cães. *Revista Veterinária e Zootecnia em Minas*, jan/fev/mar: 42-46.
- Zambelli, D., Iacono, E., Raccagni, R. & Merlo, B. 2010. Quality and fertilizing ability of electroejaculated cat spermatozoa frozen with or without Equex STM Paste. *Theriogenology*, 73: 886-892.