



Espermatozoides epididimários: refrigeração e criopreservação

Epididymal spermatozoa: refrigeration and cryopreservation

Tácia Gomes Bergstein-Galan^{1,4}, Romildo Romualdo Weiss¹, Luiz Ernandes Kozicki²,
Sony Dimas Bicudo³

¹Pós-graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

²Pós-graduação em Ciência Animal, Departamento de Medicina Veterinária, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, Paraná, Brasil.

³Pós-graduação em Biotecnologia Animal, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

⁴Correspondência: tacia@alamos.com.br

Resumo

A recuperação de espermatozoides epididimários após a morte possibilita a utilização do material genético de reprodutores de interesse zootécnico que morrem inesperadamente e de espécimes selvagens ou ameaçadas de extinção. O período máximo após a morte pelo qual os espermatozoides permanecem viáveis varia conforme a temperatura de armazenamento dos epidídimos. A refrigeração e a congelamento são os métodos utilizados para preservação espermática, contudo os espermatozoides epididimários apresentam peculiaridades em seus processos de preservação. A refrigeração de espermatozoides epididimários pode ser realizada *in situ* ou *in vitro*, sendo que estas duas formas de refrigeração apresentam vantagens e desvantagens inerentes às técnicas. Os espermatozoides epididimários apresentam maior resistência à variações de temperatura e osmolaridade que tornam os processos de preservação diferentes dos aplicados ao sêmen colhido em vagina artificial ou eletroejaculação. Esta revisão visa foi compilar trabalhos referentes à recuperação e preservação espermática epididimária.

Palavras chave: epidídimo, post mortem, preservação.

Abstract

The recovery of epididymal spermatozoa after death is used to avail genetic material of breeding herders of zootechnical interest who die unexpectedly and of wild or endangered species. The maximum post mortem period by which sperm remain viable varies with the storage temperature of the epididymis. Refrigeration and cryopreservation are methods for sperm preservation, however, epididymal spermatozoa present peculiarities in their preservation processes. The cooling of epididymal spermatozoa can be performed in situ or in vitro, these two forms of refrigeration have advantages and disadvantages inherent in the techniques. The epididymal spermatozoa have greater resistance to variations in temperature and osmolarity that make conservation processes different from those applied to semen collected in an artificial vagina or electroejaculation. This review aims to compile works referring to epididymal sperm retrieval and preservation.

Keywords: epididymis, post mortem, preservation.

Introdução

A recuperação de espermatozoides da cauda de epidídimo *post mortem* pode ser a última chance de obter o material genético de reprodutores de genótipos superiores que morrem inesperadamente (García-Álvarez et al., 2009). A cauda do epidídimo em mamíferos é responsável pelo armazenamento de espermatozoides, no macho, até o momento da ejaculação e promove um ambiente favorável às células, preservando sua capacidade de fertilização por algumas semanas (Jones, 2004). Estudos relatam que é possível recuperar espermatozoides viáveis após a morte, da cauda de epidídimo em diversas espécies (Kaabi et al., 2003; Martinez-Pastor et al., 2006; Tittarelli et al., 2006; Weiss et al., 2008; Gañan et al., 2009). Quando recuperados pouco tempo após a morte, os espermatozoides da cauda do epidídimo demonstram a mesma qualidade do sêmen colhido em vagina artificial (Álvarez et al., 2012b) e melhor qualidade quando comparado ao sêmen colhido por eletro ejaculação (García-Álvarez et al., 2009). Entretanto o tempo entre a morte e a recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo, além da temperatura de manutenção do órgão desde o óbito até a coleta e criopreservação, interferem na viabilidade e congelabilidade da amostra espermática (Martins et al., 2009; Bertol et al., 2013).

A preservação do sêmen pode ser realizada pelo método de refrigeração ou congelamento. A refrigeração prolonga a viabilidade espermática de ovinos até 48 horas após a coleta (Bergstein-Galan et al., 2016). A grande vantagem da refrigeração é que este método diminui os efeitos do choque térmico, comuns na



congelamento, que causam lesões irreversíveis às células espermáticas quando atingem temperaturas próximas a 0°C (Salamon e Maxwell, 1995). Em contrapartida, a congelamento é o método de preservação espermática definitivo, mantendo a viabilidade espermática por tempo indeterminado. Os métodos de preservação dos espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo parecem apresentar peculiaridades quando comparados ao sêmen colhido em vagina artificial ou eletro ejaculação, principalmente quanto à resistência ao choque térmico e à osmolaridade (Tamayo-Canul et al., 2011b; Alvarez et al., 2012a).

O objetivo deste trabalho foi coletar trabalhos referentes à recuperação espermática epididimária e suas peculiaridades quanto os processos de preservação.

Espermatozoides epididimários

O epidídimo compõe os órgãos genitais masculinos do aparelho urogenital e é anatomicamente dividido em três porções: cabeça, corpo e cauda. Durante o trânsito das células espermáticas pela cabeça e corpo do epidídimo ocorre a maturação espermática pós-testicular, que compreende modificações da membrana plasmática além da aquisição e desprendimento de proteínas de superfície dos espermatozoides (Vernet et al., 2004). A cauda do epidídimo é responsável pela estocagem de espermatozoides, por um longo período de tempo, até o momento da ejaculação (Fernández-Santos et al., 2009).

A obtenção de espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo de animais após a morte ou após a orquiectomia é uma opção viável para a preservação dos gametas de um reprodutor importante ou para a manutenção de bancos de germoplasma (Kaabi et al., 2003). Os procedimentos e estudos decorrentes da coleta de espermatozoides após a morte é principalmente interessante para espécies de vida livre ou ameaçadas de extinção quando a coleta do sêmen pelos métodos tradicionais (vagina artificial ou eletro-ejaculação) não são possíveis, contribuindo com a manutenção da biodiversidade (Kaabi et al., 2003; Abella et al., 2015). A coleta de espermatozoides viáveis da cauda de epidídimo já foi relatada em equinos (Weiss et al., 2008), bovinos (Bertol et al., 2016), suínos (Kikuchi et al., 1998), ovinos (Kaabi et al., 2003), caprinos (Blash et al., 2000), cervídeos (Martinez-Pastor et al., 2006), caninos e felinos (Tittarelli et al., 2006).

Os espermatozoides provenientes da cauda de epidídimo apresentam viabilidade e fertilidade similares ao sêmen colhido com vagina artificial (Álvarez et al., 2012b) e superiores ao sêmen coletado por eletro ejaculação (García-Álvarez et al., 2009). Porém, a viabilidade espermática diminui conforme aumenta o tempo *post mortem*. Barbosa et al., 2016 relataram que a correlação entre o período de tempo após a morte e motilidade total dos espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo mantido em temperatura ambiente é de $r = -0,60$. Esta depreciação é resultado da senescência dos espermatozoides e do processo de degeneração e decomposição tecidual dos epidídimos (Martinez-Pastor et al., 2005). Estudos em camundongos revelaram que alterações testiculares degenerativas iniciam aproximadamente seis horas após a morte do animal, porém, no epidídimo, essas alterações só iniciam 12 horas após a morte (Songsasen et al., 1998)

O período máximo que os espermatozoides epididimários podem ser expostos à temperatura ambiente e mantêm-se viáveis varia conforme a espécie. Em equinos, a viabilidade diminuiu a partir de seis horas após a orquiectomia (Monteiro et al. 2013). Em ovinos, estudos relatam que 24 horas *post mortem*, ocorre o decréscimo da qualidade espermática, porém, diferenças na fertilidade dos espermatozoides só ocorrem 48 horas após a morte (Kaabi et al., 2003; Bergstein-Galan et al., 2017). Em bovinos, pesquisadores relatam que 6 horas após a orquiectomia os espermatozoides recuperados de epidídimos, mantidos à temperatura ambiente, apresentam motilidade total menor quando comparado ao sêmen colhido por eletro ejaculação, porém, os defeitos morfológicos aumentam somente a partir de 12 horas após a morte (Bertol et al., 2013). Toyonaga e Tsutsui (2012) demonstraram que os espermatozoides felinos podem ser recuperados até 12 horas após a morte, quando os epidídimos são mantidos à temperatura ambiente.

Em países com dimensões continentais, quando um animal geneticamente superior morre inesperadamente, na maioria das vezes não existem técnicos e/ou equipamentos disponíveis para recuperar e criopreservar o sêmen em um curto período de tempo (Martins et al., 2009), logo, estudos sobre a preservação dos espermatozoides têm sido realizados a fim de aumentar o período de viabilidade após a coleta dos espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo. Segundo Kaabi et al., (2003) a temperatura em que os epidídimos são mantidos interfere na viabilidade das amostras seminais.

Refrigeração de espermatozoides epididimários

A refrigeração espermática prolonga, em horas ou dias a viabilidade dos espermatozoides sem que haja danos causados pelo processo de congelamento. Quando o sêmen ovino é refrigerado, este pode ser armazenado até 48 horas após a coleta (Moscardini et al., 2014; Bergstein-Galan et al., 2016), porém, a fertilidade diminui após 24 horas de refrigeração na inseminação artificial cervical (O'Hara et al., 2010). A refrigeração dos espermatozoides da cauda de epidídimo pode ser realizada de duas formas: quando o complexo testículo-epidídimo é refrigerado inteiro ou quando os espermatozoides são recuperados e posteriormente refrigerados.

Existe um consenso entre os autores de que a refrigeração do epidídimo a 5°C, antes da recuperação



espermática, aumenta o período de viabilidade dos espermatozoides recuperados (Fernández-Santos et al., 2009; Maroto-Morales et al., 2010; Monteiro et al., 2013; Nichi et al., 2016; O'Hara et al., 2010). Em ovinos, quando os epidídimos são refrigerados, os espermatozoides recuperados não apresentam alterações significativas pelo período de 24 horas (Kaabi et al., 2003; Tamayo-Canul et al., 2011a). Em equinos, quando os epidídimos são refrigerados a 5°C os espermatozoides epididimários mantêm motilidade total, motilidade progressiva e integridade similares aos espermatozoides recuperados logo após a castração pelo período de 30 horas (Monteiro et al., 2013a). Filho et al., (2013) ao refrigerarem, à 4°C, epidídimos de cães identificaram decréscimo da motilidade progressiva e parâmetros cinéticos 18 horas após a orquiectomia. A motilidade de espermatozoides epididimários provenientes de epidídimos bovinos refrigerados a 5°C decai 48 horas após a morte (Martins et al., 2009). As diferenças entre espécies quanto ao período de viabilidade espermática epididimária, são possivelmente por variações na resiliência dos espermatozoides epididimários frente ao choque térmico (Martinez-Pastor et al., 2005).

Alguns autores compararam os dois métodos de refrigeração de espermatozoides epididimários. Tamayo-Canul et al. (2011a) colacionaram, em ovinos, a refrigeração do epidídimo inteiro antes da recuperação espermática (In-EPID{ XE "In-EPID:dentro do epidídimo" }) e a refrigeração de espermatozoides colhidos, diluídos e refrigerados a 5°C (Ex-EPID{ XE "Ex-EPID:fora do epidídimo" }). Esses autores reportaram superioridade dos espermatozoides mantidos diluídos e refrigerados a 5°C nas primeiras 24 horas quando comparados aos espermatozoides mantidos nos epidídimos refrigerados. Entretanto, as amostras Ex-EPID{ XE "Ex-EPID:fora do epidídimo" } apresentaram maior porcentagem de lesão de acrossoma quando comparadas aos espermatozoides mantidos no epidídimo pelo mesmo período de tempo. De forma similar, (Fernández-Santos et al., 2009) relataram, em cervídeos, que a manutenção dos espermatozoides estocados dentro de epidídimos refrigerados retardou a perda da motilidade, porém, a viabilidade espermática foi menor 192 horas *post mortem* quando comparado aos espermatozoides recuperados e refrigerados *in vitro*. Provavelmente, o contato dos espermatozoides com os fluidos intersticiais do tecido epididimário em decomposição aumente a ação das espécies reativas do oxigênio (ROS{ XE "ROS:espécies reativas do oxigênio" }) levando à depreciação da viabilidade espermática. Martinez-Pastor et al., (2006) ao comparar dois métodos de recuperação de espermatozoides epididimários (secção ou lavagem retrógrada) de cervídeos identificaram que o método de secção promove maior contaminação dos espermatozoides por sangue e tecido intersticial. Os mesmos autores indicam a rápida diluição dos espermatozoides em extensores com componentes tampão para evitar a formação de ROS e o cerceamento da viabilidade espermática.

A diluição de espermatozoides oriundos de epidídimos em um meio tamponado reduz o efeito negativo do fluido intersticial e do sangue sobre os espermatozoides (Tamayo-Canul et al., 2011a). Bertol et al. (2013) relataram que espermatozoides bovinos provenientes da cauda de epidídimo mantem-se viáveis pelo período de 36 horas após recuperação, diluição e refrigeração a 5°C. Abella et al. (2015) relataram superioridade do diluente "Bel 24" (170 mM{ XE "mM:milimolar" } glicose, 50 mM{ XE "mM:milimolar" } bicarbonato de potássio, 30 mM{ XE "mM:milimolar" } ácido glutâmico, 50 mM{ XE "mM:milimolar" } glicina, 10 mM{ XE "mM:milimolar" } prolina, 10 mM{ XE "mM:milimolar" } mio-isonitol, 20 mM{ XE "mM:milimolar" } D-manitol, 0.4% BSA{ XE "BSA:Bovine Serum Albumin" } e 20% de gema de ovo) quando comparado ao meio diluidor constituído de leite desnatado na manutenção de espermatozoides ovinos colhidos da cauda de epidídimo de carneiros. Os mesmos autores descreveram motilidade total de 18% no meio Bel 24 e 0% no meio com leite desnatado após 72 horas de refrigeração à 4°C.

Ainda que a refrigeração aumente o período de viabilidade espermática quando comparado à temperatura ambiente, este método possibilita um prolongamento de viabilidade espermática limitado à alguns dias (Salamon e Maxwell, 2000). Contudo a congelação e armazenamento dos espermatozoides em nitrogênio líquido (-196°C) mantém a capacidade fertilizante dos espermatozoides por período indefinido (Vishwanath e Shannon, 2000).

Congelamento de espermatozoides epididimários

Alguns autores relatam que o sêmen proveniente da cauda de epidídimo é mais resistente ao estresse térmico e osmótico quando comparado ao sêmen colhido em vagina artificial em equinos (Monteiro et al., 2013) e ao sêmen colhido com eletro ejaculação em ovinos (Varisli et al., 2009). Todavia (Bergstein-Galan et al., 2017a) relataram não haver diferença na viabilidade espermática e fertilidade após inseminação artificial intrauterina, em ovelhas, com espermatozoides recuperados de epidídimos e ejaculados coletados em vagina artificial.

Monteiro et al. (2013) relataram superioridade, após a criopreservação, dos espermatozoides colhidos da cauda de epidídimo de garanhões nos parâmetros cinéticos, integridade de membranas e status apoptótico quando comparado ao sêmen colhido em vagina artificial.

Álvarez et al. (2012b) avaliaram a constituição dos meios diluidores para criopreservação de sêmen ovino colhido por eletro ejaculação, vagina artificial e espermatozoides recuperados da cauda de epidídimo. Esses autores identificaram que o diluidor composto por 20% de gema de ovo e concentração de 8% de glicerol é



mais adequado para criopreservação de espermatozoides recuperados do epidídimo quando comparado a diluidores com 10% de gema de ovo e 4% de glicerol. Os mesmos autores sugeriram que, pela maior resiliência dos espermatozoides da cauda de epidídimo ao estresse osmótico, a concentração mais alta de glicerol possibilitou maior proteção durante a criopreservação.

As condições de temperatura e tempo de estocagem dos epidídimos no período entre a morte e a congelamento alteram a qualidade espermática após a descongelamento. Bertol et al. (2016) avaliaram o efeito da exposição do complexo testículo-epidídimo de bovinos à temperatura ambiente (18-20°C) após a castração, na viabilidade e fertilidade dos espermatozoides após a criopreservação. Esses autores relataram diminuição da motilidade total e integridade de membrana plasmática pós-descongelamento de espermatozoides coletados e congelados, do complexo testículo-epidídimo expostos previamente à temperatura ambiente, por 30 horas. Em contrapartida, quando espermatozoides bovinos são congelados, após os complexos testículo-epidídimo serem refrigerados por até 72 horas após a morte do animal, ao descongelamento, estes espermatozoide mantêm a viabilidade de fertilização (Martins et al. 2009).

Kaabi et al. (2003) estudaram o efeito da temperatura (temperatura ambiente e 5°C) e tempo de estocagem (0, 24 ou 48 h) de epidídimos ovinos na qualidade e fertilidade espermática após descongelamento. Os mesmos autores relataram diminuição da motilidade total e progressiva após a descongelamento a partir de 24 horas quando os epidídimos foram mantidos à temperatura ambiente antes do congelamento e, a partir de 48 horas quando os epidídimos foram refrigerados a 5°C antes do congelamento. Segundo Bergstein-Galan et al. (2017a) quando os epidídimos ovinos são expostos a temperatura ambiente é possível criopreservar espermatozoides epididimários até 24 horas após a morte sem diminuição da viabilidade e fertilidade quando comparado ao sêmen coletado em vagina artificial. Todavia a partir de seis horas após a morte o padrão de movimentos dos espermatozoides epididimários de ovinos é alterado, com a diminuição da porcentagem de espermatozoides com movimento rápido e linear e aumento da porcentagem de espermatozoides com movimento lento e não linear (Bergstein-Galan et al., 2017b).

Em equinos, quando amostras epididimárias foram avaliadas após a descongelamento, a motilidade progressiva foi o parâmetro mais sensível ao tempo e à temperatura de estocagem dos epidídimos, diminuindo a partir de 6 horas quando os epidídimos foram mantidos à temperatura ambiente, e a partir de 18 horas quando foram mantidos refrigerados a 5°C (Monteiro et al, 2013).

Considerações finais

A recuperação de espermatozoides após a morte permite o aproveitamento final do material genético de um reprodutor de interesse. A preservação dos espermatozoides epididimários garante maior aproveitamento deste material genético. Contudo o período entre a morte e a preservação, além da temperatura de manutenção da cauda dos epidídimos influencia na viabilidade espermática após a preservação. Os espermatozoides epididimários apresentam peculiaridades quanto a resistência à variações de temperatura e osmolaridade que tornam os processos de preservação diferentes dos aplicados ao sêmen colhido em vagina artificial ou eletroejaculação, sendo que os métodos de preservação devem ser adaptados à origem dos espermatozoides.

Agradecimentos

T. G. Bergstein-Galan agradece à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

Referências

- Abella DF, Costa M, Guérin Y, Dacheux JL.** Fertility of undiluted ram epididymal spermatozoa stored for several days at 4°C. *Animal*, v.9, n.2, p.313-319, 2015.
- Alvarez M, Tamayo-Canul J, Anel E, Boixo JC, Mata-Campuzano M, Martinez-Pastor F, Anel L, de Paz P.** Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*, v.77, n.6, p.1111-1118, 2012.
- Álvarez M, Tamayo-Canul J, Martínez-Rodríguez C, López-Urueña E, Gomes-Alves S, Anel L, Martínez-Pastor F, de Paz P.** Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends of the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis). *Animal Reproduction Science*, v.132, n.3-4, p.145-154, jun. 2012.
- Barbosa TSR, Weiss RR, Bergstein-Galan TG, Bertol MAF.** Comparação da avaliação in vitro de espermatozoides colhidos em vagina artificial ou cauda de epidídimo em carneiros. *Anais... Semana Integrada de Ensino Pesquisa e Extensão, 24º Evento de Iniciação Científica (EVINCI), 2016 e 9º Evento de Iniciação Tecnológica e Inovação (EINTI), UFPR, Curitiba, PR, v.24, p.913, 2016.*
- Bergstein-Galan TG, Weiss RR, Bertol MAF, Abreu ACMR, Wesolovsky A.** Comparação de três métodos de refrigeração do sêmen ovino pelo período de 24 e 48 horas. *Archives of Veterinary Science*, v.21, n.4, p.66-73, 2016.



- Bergstein-Galan TG, Weiss RR, Bertol MAF, Abreu ACMR, Busato E, Kozicki LE, Bicudo SD.** Quality and fertility of frozen ovine spermatozoa from epididymides stored at room temperature (18-25°C) for up to 48 h post mortem. *Theriogenology*, v.96, p.69-75, 2017a.
- Bergstein-Galan TG, Weiss RR, Kozicki LE, Bicudo SD.** Sperm subpopulations in ejaculated sperm and spermatozoa recovered from ovine epididymides up to 48h after death. *Animal Reproduction Science*, v.187, p.20-27, 2017b.
- Bertol MAF, Weiss RR, Thomaz-Soccol V, Kozicki LE, Fujita AS, Abreu RA, Green KT.** Viability of bull spermatozoa collected from the epididymis stored at 18-20°C. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 56, n.5, p.777-783, 2013.
- Bertol MAF, Weiss RR, Kozicki LE, Abreu ACMR, Pereira JFS, da Silva JJ.** *In vitro* and *in vivo* fertilization potential of cryopreserved spermatozoa from bull epididymides stored for up to 30 hours at ambient temperature (18°C-20°C). *Theriogenology*, v.86, n.4, p. 1014-1021, 2016.
- Blash S, Melican D, Gavin W.** Cryopreservation of epididymal sperm obtained at necropsy from goats. *Theriogenology*, v.54, n.6, p.899-905, 2000.
- Fernández-Santos MR, Domínguez-Rebolledo AE, Estes MC, Garde JJ, Martínez-Pastor F.** Refrigerated storage of red deer epididymal spermatozoa in the epididymis, diluted and with vitamin c supplementation. *Reprod Domest Anim*, v.44, n.2, p. 212-220, 2009.
- Mota Filho AC, Silva HVR, Freitas LA, Nunes TGP, Araújo AA, Silva LDM.** Refrigeração do epidídimo canino a 4°C e recuperação dos espermatozoides epididimários utilizando ACP-106c. *Pesq Vet Bras*, v.33, n.9, p.1155-1160, 2013.
- Gañán N, Gomendio M, Roldan ER.** 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.
- García-Alvarez O, Maroto-Morales A, Martínez-Pastor F, Garde JJ, Ramón M, Fernández-Santos MR, Estes MC, Pérez-Guzmán MD, Soler AJ.** Sperm characteristics and *in vitro* fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection. *Theriogenology*, v.72, n.2, p.160-168, 2009.
- Jones R.** Sperm survival versus degradation in the mammalian epididymis: A hypothesis. *Biol Reprod*, v.75, p.1405-1411, 2004.
- Kaabi M, Paz P, Alvarez M, Anel E, Boixo JC, Rouissi H, Herraes P, Anel L.** Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. *Theriogenology*, v. 60, p. 1249-1259, 2003.
- Kikuchi K, Nagai T, Kashiwazaki N, Ikeda H, Noguchi J, Shimada A, Soloy E, Kaneko H.** Cryopreservation and ensuing *in vitro* fertilization ability of boar spermatozoa from epididymides stored at 4°C. *Theriogenology*, v.50, n.4, p. 615-623, 1998.
- Maroto-Morales A, Ramón M, García-Alvarez O, Soler AJ, Estes MC, Martínez-Pastor F, Pérez-Guzmán MD, Garde JJ.** Characterization of ram (*Ovis aries*) sperm head morphometry using the Sperm-Class Analyzer. *Theriogenology*, v.73, n.4, p.437-448, 2010.
- Martinez-Pastor F, Guerra C, Kaabi M, Diaz AR, Anel E, Herraes P, de Paz P, Anel L.** Decay of sperm obtained from epididymes of wild ruminants depending on postmortem time. *Theriogenology*, v.63, n.1, p.24-40, 1 jan. 2005.
- Martinez-Pastor F, Garcia-Macias V, Alvarez M, Chamorro C, Herraes P, de Paz P, Anel L.** Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*, v.65, n.3, p.471-485, 2006.
- Martins CF, Driessen K, Costa PM, Carvalho-Neto JO, de Sousa RV, Rumpf R, Dode MN.** Recovery, cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained from epididymides stored at 5°C by different periods of time. *Anim Reprod Sci*, v.116, n.1, p. 50-57, 2009.
- Monteiro GA, Guasti PN, Rocha AS, Martin I, Sancler-Silva YFR, Dell'Aqua CPF, Dell'Aqua Jr JA, Papa FO.** Effect of Storage Time and Temperature of Equine Epididymis on the Viability, Motion Parameters, and Freezability of Epididymal Sperm. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, n.3, p.169-173, 2013a.
- Monteiro GA, Freitas-Dell'Aqua CP, Guasti PN, Dell'Aqua Jr JA, Alvarenga MA, FC Landim, Papa FO.** Comparison of apoptotic cells between cryopreserved ejaculated sperm and epididymal sperm in stallions. *Journal of Equine Veterinary Science*, v.33, n.7, p.552-556, 2013b.
- Moscardini MM, Scott C, Moura DS, Lourenço TT, Aristizábal VHV, FF Souza.** Viabilidad de espermatozoides ovinos mantenidos a 5° y 15°C en diferentes sistemas de refrigeración. *Rev Bras Ci Vet*, v.21, n.2, p. 122-126, 2014.
- Nichi M, Rijsselaere T, Losano JDA, Angrimani DSR, Kawai GKV, Goovaerts IGF, Van Soom A, Barnabe VH, De Clercq JBP, Bols PEJ.** Evaluation of epididymis storage temperature and cryopreservation conditions for improved mitochondrial membrane potential, membrane integrity, sperm motility and *in vitro* fertilization in bovine epididymal sperm. *Reprod Domest Anim*, v.52, n.2, p. 257-263, 2016.
- O'Hara L, Hanrahan JP, Richardson L, Donovan A, Fair S, Evans AC, Lonergan P.** Effect of storage duration, storage temperature, and diluent on the viability and fertility of fresh ram sperm. *Theriogenology*, v.



73, n.4, p. 541-549, 2010.

Salamon S, Maxwell WMC. Frozen storage of ram semen II. Causes of low fertility after cervical insemination and methods of improvement. *Anim Reprod Sci*, v.38, n.1-2, p.1-36, 1995.

Salamon S, Maxwell WMC. Storage of ram semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, n.1-3, p.77-111, 2000.

Songsasen N, Tong J, Leibo S. Birth of live mice derived by in vitro fertilization with spermatozoa retrieved up to twenty-four hours after death. *J Exp Zool*, v.280, n.2, p.189-196, 1998.

Tamayo-Canul J, Alvarez M, López-Urueña E, Nicolas M, Martínez-Pastor F, Anel E, Anel L, de Paz P. Undiluted or extended storage of ram epididymal spermatozoa as alternatives to refrigerating the whole epididymes. *Anim Reprod Sci*, v.126, n.1-2, p.76-82, 2011a.

Tamayo-Canul J, Alvarez M, Mata-Campuzano M, Alvarez-Rodríguez M, de Paz P, Anel L, Martínez-Pastor F. Effect of storage method and extender osmolality in the quality of cryopreserved epididymal ram spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.129, n.3-4, p.188-199, 2011b.

Tittarelli C, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli MA, de la 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.1637-1640, 2006.

Toyonaga M, Tsutsui T. The Quality of Cryopreserved Sperm Collected from Feline Caudal Epididymides Using Seminal Plasma. *J Vet Med Sci*, v.74, n.10, p.1349-1353, 2012.

Varisli O, Uguz C, Agca C, Agca Y. Motility and acrosomal integrity comparisons between electro-ejaculated and epididymal ram sperm after exposure to a range of anisotonic solutions, cryoprotective agents and low temperatures. *Anim Reprod Sci*, v.110, n.3, p.256-268, 2009.

Vernet P, Aitken RJ, Drevet JR. Antioxidant strategies in the epididymis. *Mol Cell Endocrinol*, v.216, n.1-2, p. 31-39, 2004.

Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. *Anim Reprod Sci*, v.62, n.1-3, p.23-53, 2000.

Weiss RR, Muradas, PR, Graneman LC, Meira C. Freezing sperm from cauda epididymis of castrated stallions. *Anim Reprod Sci*, v.107, n.3-4, p.356, 2008.
