



Técnicas alternativas para colheita de sêmen de cão

Alternative dog semen collection techniques

Regina Celia Rodrigues da Paz, Antonio Henrique Kuczmariski

Laboratório de Pesquisa em Animais de Zoológico, Faculdade de Medicina Veterinária,
Universidade Federal de Mato Grosso

Resumo

Métodos eficazes para a colheita de sêmen permitem avanços na inseminação artificial em cães domésticos e canídeos selvagens geneticamente valiosos, permitindo a manutenção de linhagens genéticas e possibilitando a propagação de material genético *post-mortem*, bem como, diminuindo os custos e os riscos de transporte de animais para reprodução. Dentre os métodos de colheita de sêmen utilizados em cães, podemos destacar os métodos ejaculatórios como a manipulação digital e a eletroejaculação; e os métodos não ejaculatórios, que compreendem aqueles que envolvem os espermatozoides coletados do epidídimo, em casos de óbito ou orquiectomia ou em animais submetidos a vasectomia. Mais recentemente a colheita farmacológica de sêmen foi descrita em cães como um método não ejaculatório eficiente. Essa nova metodologia de colheita de sêmen surge como mais uma alternativa para facilitar a colheita de sêmen em cães domésticos que não aceitam a manipulação digital e eliminar a necessidade da eletroejaculação em animais selvagens. No entanto, os protocolos anestésicos utilizados ainda apresentam alguns efeitos colaterais indesejáveis, indicando que novos protocolos, mais seguros para a colheita de sêmen via cateterismo uretral necessitam ser testados.

Palavras-chave: Colheita epididimária, colheita farmacológica de sêmen, alfa-2 adrenérgico, reprodução, canídeos.

Abstract

Effective methods for semen collection are determinant for artificial insemination advances in genetically valuable domestic dogs and wild canids, allowing the genetic maintenance and enabling the post-mortem genetic material use, as well as, reducing the animals transporting costs and risks for breeding. The semen collection methods used in canids are ejaculatory methods, such as digital manipulation in dogs and electroejaculation in wild canids; and non-ejaculatory methods, which include sperm collected from epididymis after death or vasectomy. More recently, pharmacological semen collection was described in dogs as an efficient non-ejaculatory method. This new semen collection methodology emerges as another alternative to facilitate semen collection in domestic dogs that do not accept digital manipulation and eliminate the electroejaculation in wild animals. However, side effects undesirable was observed indicating that new anesthetic protocols, safer for semen collection via urethral catheterization, need to be tested.

Keywords: epididymal collection, pharmacological semen collection, alpha-2 adrenergic, reproduction, canids.

Introdução

Além do papel social exercido pelos cães influenciar a demanda de estudos focados na criopreservação das células espermáticas, os avanços na área da biotecnologia reprodutiva possuem grande importância nos estudos destinados à conservação de canídeos ameaçados de extinção.

Dentre os métodos de colheita de sêmen utilizados em cães podemos citar os métodos ejaculatórios como a manipulação digital e a eletroejaculação, sendo a manipulação digital o método de colheita de células espermáticas mais utilizado em cães e a eletroejaculação o método de eleição para animais selvagens.

Os métodos não ejaculatórios compreendem aqueles que envolvem os espermatozoides coletados da cauda do epidídimo em caso de óbito do reprodutor ou coletados diretamente do epidídimo em animais

¹Correspondência: reginacrpaz@gmail.com

Recebido: 30 de agosto de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



submetidos a vasectomia. Mais recentemente a colheita farmacológica de sêmen foi descrita como um método não ejaculatório viável para colheita de sêmen.

Em canídeos a colheita farmacológica de sêmen foi inicialmente testada em lobos vermelhos (*Canis rufus*), no entanto, as amostras de sêmen apresentaram alta contaminação por urina (Franklin; Waddell; Goodrowe, 2018). Em cães a colheita de sêmen por cateterismo uretral após estímulo farmacológico utilizando fármacos alfa-2 adrenérgicos foi descrita pela primeira vez por Kuczmarski et al. (2020).

Essa nova metodologia de colheita de sêmen surge como mais uma alternativa para facilitar a colheita de sêmen em cães domésticos que não aceitam a manipulação digital e eliminar a necessidade de eletroejaculação em animais selvagens.

Métodos ejaculatórios de colheita de sêmen

Manipulação digital

É o método mais comum para colheita de sêmen em cães, em condições ideais ocorre com a presença de uma fêmea no estro. Porém, a ausência da fêmea não impede o sucesso na colheita, sendo imprescindível a remoção de qualquer distração ou fator estressante do ambiente (Kutzler, 2005).

A técnica baseia-se em massagear a glândula do cão até ocorrer o ingurgitamento do bulbo peniano e exposição do pênis, caracterizando a ereção. Em ato contínuo, o bulbo é posicionado na palma da mão do técnico que irá realizar uma pressão constante de forma a simular a vagina durante a cópula (Begum; Bhuvaneshwari, 2018).

Em seguida à ereção o macho tenta rotacionar, demonstrado pela tentativa de passar a perna por cima do braço do técnico que está coletando o sêmen, rotacionando o pênis em 180°. A pressão deverá ser mantida até o momento da ejaculação, sendo que cada fração do ejaculado deve ser coletada em tubos diferentes (Kutzler, 2005).

Eletroejaculação

A eletroejaculação é recomendada para cães agressivos, que não aceitam a manipulação digital. Também é utilizada em canídeos selvagens, devido ao fato de poder ser realizada em animais anestesiados.

O aparelho utilizado para a geração dos eletrochoques é semelhante ao utilizado para eletroejaculação em bovino, com eletrodos retais bipolares com tiras longitudinais em cobre e diâmetro com medidas proporcionais ao porte do animal. Em canídeos a contaminação do ejaculado por urina ocorre com relativa frequência (Nagashima; Songsasen, 2021). Uma das alternativas para minimizar este problema seria a drenagem da urina por cateterização ou cistocentese, antes do início dos eletrochoques.

Do ponto de vista ético a eletroejaculação vem sendo cada vez mais questionada, sendo restrita em alguns países. No entanto, mesmo havendo a necessidade de anestésiar o animal e comprovando ser uma técnica segura, é certo que o procedimento de eletroejaculação, por vezes, não apresenta resultados satisfatórios. A contaminação do ejaculado por urina utilizando esse método em cães é frequente, bem como o fato de apresentarem a presença de ejaculados com grande volume e baixa concentração espermática, quando comparados a outros métodos de colheita.

Métodos não ejaculatórios

Colheita epididimária

Esse método de colheita se baseia na recuperação de células espermáticas mantidas na cauda do epidídimo em animais de alto valor genético após orquiectomia, vasectomia ou naqueles que vieram à óbito. As técnicas utilizadas são a lavagem (*flushing*), a compressão (*squeezing*) e o fatiamento (*slicing*).

Em raças de grande porte pode-se realizar a lavagem do epidídimo (*flushing*) introduzindo-se meio de cultura (Hepes, Ham's F10, Tris-frutose citrato com gema de ovo ou fluido prostático) em um cateter inserido no ducto deferente. Com o auxílio de uma seringa realiza-se a lavagem, coletando a amostra em tubos cônicos graduados ou placas de Petri, sendo de suma importância a padronização dos volumes utilizados para padronizar o protocolo (Paz, 2013; Hori et al., 2017).

Em raças de médio e pequeno porte a colheita pode ser feita por compressão (*Squeezing*), onde o



epidídimo é comprimido em direção aos ductos deferentes com o auxílio de uma pinça ou lâmina histológica, conduzindo seu conteúdo diretamente em uma placa de Petri aquecida contendo meio diluidor. (Martins et al., 2009, 2012; Iranpour; Valojerdi, 2013).

Em raças de pequeno porte (mini) o fatiamento do epidídimo (*Slicing*) pode ser uma alternativa quando os métodos anteriores se tornam inviáveis em consequência ao tamanho reduzido do testículo, no entanto, esta técnica pode apresentar contaminação da amostra, o que por vezes inviabiliza o uso dos espermatozoides. Nesta técnica a cauda do epidídimo é dissecada, fatiada com o auxílio de uma lâmina de bisturi e colocada em placa de Petri aquecida contendo meios diluidores (Korochkina et al., 2014). Após 10-15 minutos de incubação os tecidos são removidos e a suspensão deve então ser filtrada ou centrifugada para recuperação dos espermatozoides (Hori et al., 2015).

Para qualquer uma das técnicas citadas é necessária a dissecação completa do epidídimo, removendo todos os tecidos adjacentes e vasos sanguíneos para se evitar a contaminação da amostra.

É recomendada a colheita e o processamento dos espermatozoides epididimários imediatamente após o óbito ou orquiectomia, buscando a otimização da manutenção e utilização deste material genético. As células espermáticas possuem capacidade de sobrevivência por algum tempo nos epidídimos excisados cirurgicamente ou no corpo de animais em óbito, porém conforme a necrose tecidual avança decorrente da decomposição a qualidade seminal diminui significativamente (Songsasen; Tong; Leibo, 1998).

A refrigeração dos testículos a 5°C logo após o óbito ou orquiectomia é recomendada, prolongando a sobrevivência dos espermatozoides epididimários permitindo um maior tempo hábil para realizar a colheita e processamento, sendo possível manter armazenado por até 48h até apresentar diferenças significativas na qualidade espermática (Gañán; Gomendio; Roldan, 2009).

A aspiração percutânea é realizada em animais que não possuem capacidade de se reproduzir naturalmente devido a impossibilidades físicas, fisiológicas ou alterações comportamentais, mas as quais deseja-se manter o potencial reprodutivo. O escroto é limpo com solução antisséptica e a cauda do epidídimo é palpada e estabilizada com o dedo indicador e o polegar, uma seringa contendo meio HEPES e/ou Ham's F-10 acoplada a uma agulha 26-G é inserida na região da cauda epididimária. A aspiração é realizada, mantendo a pressão negativa enquanto a agulha é removida parcialmente e delicadamente movida para uma posição diferente diversas vezes em 360°, a amostra coletada é transferida para um tubo pré-aquecido e feita as análises seminais (Varesi et al., 2013).

Colheita farmacológica de sêmen

Dentre as técnicas alternativas de colheita de sêmen em cães podemos citar a eletroejaculação e a aspiração percutânea da cauda do epidídimo. No entanto, essas técnicas não são amplamente aceitas pelos tutores. Neste contexto, a nova técnica de colheita farmacológica do sêmen por cateterismo uretral surge como uma alternativa viável para solucionar este problema.

A colheita de sêmen farmacológica baseia-se no fato dos agentes α -adrenérgicos atuarem em α -adrenoreceptores determinando a contração dos ductos deferentes (Macdonald; Mcgrath, 1980), o que pode determinar uma alta concentração de espermatozoides liberados na uretra, após a administração de fármacos como a detomidina, a medetomidina e a dexmedetomidina, tornando possível a colheita de sêmen sem ejaculação.

O efeito dos medicamentos α -adrenérgicos nos ductos deferentes foi demonstrado inicialmente em ratos, onde a resposta muscular ao utilizar agonistas alfa-adrenérgicos aumentou de acordo com a dose utilizada (Macdonald; Mcgrath, 1980). No entanto a observação de alta concentração de espermatozoides liberados na uretra, após a administração do fármaco, foi observado primeiramente em equinos (McDonnell; Odian, 1994; Turner; McDonnell; Hawkins, 1995).

A partir desse estudo foi demonstrado que o uso de fármacos α 2-adrenérgicos, utilizados na indução anestésica, levam à liberação espontânea de células espermáticas na uretra, devido à contração causada nos ductos deferentes, facilitando assim a colheita de sêmen em várias espécies (Zambelli et al., 2007, 2008, 2010; Swanson; Bateman; Vansandt, 2016; Iglesias et al., 2020).

Em pequenos animais foi inicialmente descrita em gatos domésticos utilizando-se como protocolo anestésico a associação dos fármacos medetomidina (100 μ g/kg) e cetamina (5mg/kg). Após a indução, um cateter uretral (Tom cat – 1mm x 13cm) foi inserido a aproximadamente 9,0 cm dentro da uretra, permitindo que o sêmen penetrasse no cateter por capilaridade, resultando na possibilidade de colheita de sêmen sem ejaculação em felinos (Zambelli et al., 2007).

Em cães foi descrita inicialmente utilizando-se como protocolo anestésico a associação dos fármacos dexmedetomidina/cetamina (Kuczmarski et al., 2020). Para a determinação da dose mínima de



dexmedetomidina para colheita farmacológica foram utilizadas doses crescentes de dexmedetomidina associada à cetamina por via intramuscular atingindo a dose mínima necessária de 15µg/kg dexmedetomidina – 3mg/kg cetamina para que ocorresse a obtenção de sêmen (Kuczmarski et al., 2020).

Ultrassonografia inguinal foi utilizada para definir o caminho do cateter até a região pré-prostática sem que houvesse contaminação do sêmen por urina, sendo que após estabelecido o comprimento ideal de introdução do cateter de acordo com o porte do animal não se faz necessário o monitoramento ultrassonográfico durante as colheitas. Segundo Kuczmarski et al., 2020, para cães entre 5-10kg deve-se utilizar cateter uretral redondo e fenestrado nº06, sendo o comprimento ideal de introdução do cateter na uretra de 13cm.

Em cães há necessidade do esvaziamento da vesícula urinária antes do procedimento anestésico para evitar contaminação do sêmen por urina, entretanto mesmo com a realização desse procedimento, a contaminação das amostras por urina não foi completamente eliminada.

Após a administração do fármaco deve-se esperar vinte minutos para introdução do cateter, o qual deve ser mantido por um minuto em posição, rolado gentilmente e em seguida removido da uretra. A distância do cateter preenchida com líquido seminal determina o volume total de sêmen obtido (1cm = 12µL) (Kuczmarski et al., 2020).

Após o estabelecimento da dose e do comprimento ideal de introdução do cateter para cães de 5-10kg, sêmen foi coletado em 8 cães, sendo a média/SE das características seminais desses animais de 0.087 ± 0.027 para volume, 60.5 ± 8.08 para motilidade, 1.9 ± 0.28 para vigor, 2.458 ± 1.303.44x10⁶ para concentração, 84.2 ± 13.97 para integridade de membrana e 75.2 ± 18.83 para integridade de acrossoma.

A colheita de sêmen por cateterismo uretral após indução farmacológica apresenta baixo volume de sêmen, porém alta concentração espermática quando comparada as técnicas de colheita ejaculatórias.

Em estudo comparando as técnicas não ejaculatórias de colheita de sêmen em gatos domésticos (epididimária por fatiamento e colheita farmacológica por cateter uretral) os resultados foram similares quanto à capacidade de fertilização, indicando a obtenção de células viáveis para IA ou FIV (Filliers et al., 2010).

Em trabalho avaliando-se a criopreservação do sêmen, a colheita farmacológica obteve resultados semelhantes e, em alguns aspectos, até melhores comparados a espermatozoides coletados do epidídimo, indicando que a qualidade do sêmen pós congelamento não diferiu de acordo com a técnica de colheita utilizada em gatos domésticos (Prochowska; Nizański; Partyka, 2016).

No entanto, um fato que deve ser levado em conta é a necessidade de altas doses dos fármacos para obtenção do sêmen. Comparando as características de sêmen coletado por cateterismo uretral em gatos domésticos, utilizando doses de 130 e 50µg/kg de medetomidina, houve comprometimento significativo do volume de sêmen, motilidade e concentrações espermáticas na dose mais baixa (50µg/kg) (Cunto et al., 2015), sendo que alta qualidade do sêmen, apresentando boa concentração espermática apesar do baixo volume, somente foi conseguida com doses iguais ou superiores a 100µg/kg (Zambelli et al., 2007, 2008, 2010; Prochowska et al., 2015; Prochowska; Nizański; Partyka, 2016).

A necessidade de altas doses desses fármacos pode aumentar os riscos dos efeitos colaterais, especialmente no sistema cardiovascular, podendo inviabilizar sua utilização em alguns animais. Houve significantes efeitos hemodinâmicos no coração de felinos, como redução dos batimentos cardíacos e queda da função sistólica quando a dose de 130µg/kg de medetomidina foi utilizada (Romagnoli et al., 2016). Devido a esses efeitos colaterais dos α-adrenérgicos são necessários mais estudos para elaborar protocolos que associem a segurança e a eficiência quando se trata de colheita farmacológica em cães.

Dentre os agentes α-adrenérgicos utilizados com essa finalidade, apenas a detomidina e a dexmedetomidina estão disponíveis no Brasil. Dessa forma a utilização da dexmedetomidina, por apresentar similaridades a medetomidina quanto à sedação e analgesia, apresentando maior especificidade para alfa-2-receptores, e, portanto, necessitando de doses mais baixas comparada a detomidina apresenta-se como o fármaco de eleição para cães. Outro fato que proporciona segurança quanto a utilização de doses mais altas desses fármacos é a possibilidade de utilização do reversor (Atipamizole), em situações de risco ao animal.

De acordo com os promissores resultados encontrados em cães acreditamos que a colheita farmacológica de sêmen por cateter uretral seja uma técnica alternativa viável em cães domésticos e também em canídeos selvagens.

Considerações finais

Considerando que o método de colheita deve prover amostras de boa qualidade e o mínimo



estresse ao animal, a colheita de sêmen pelo método do cateterismo uretral, após indução farmacológica, surge como uma alternativa viável em cães, facilitando a aplicação das Tecnologias de Reprodução Assistida.

Essa técnica tem apresentado vantagens por ser pouco invasiva e, portanto, mais aceitável pelos tutores. Além disso, tem se mostrado eficiente não somente para aplicação das Tecnologias de Reprodução Assistida, mas também para acessar condições clínicas de infertilidade dos machos.

Além de ser uma colheita fácil e rápida de ser realizada, apresenta ainda, como vantagem não necessitar de equipamento especializado ou treinamento prévio.

No entanto, os protocolos anestésicos utilizados ainda apresentam alguns efeitos colaterais indesejáveis, indicando que novos protocolos alternativos, mais seguros, para a colheita de sêmen via cateterismo uretral necessitam ser testados.

Referências

- Begum MM, Bhuvaneshwari V.** Collection and Intra-Vaginal Insemination of Fresh Semen with Prostatic Fluid in a 2 Year Old Beagle. *Indian Veterinary Journal*, v.95, n.5, p.83–84, 2018.
- Cunto M. et al.** Influence of Different Protocols of Urethral Catheterization after Pharmacological Induction (Ur.Ca.P.I.) on Semen Quality in the Domestic Cat. *Reproduction in Domestic Animals*, v.50, n.6, p.999–1002, 2015.
- Filliers M. et al.** In vitro evaluation of fresh sperm quality in tomcats: A comparison of two collection techniques. *Theriogenology*, v.74, n.1, p.31–39, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.12.016>>.
- Franklin AD, Waddell WT, Goodrowe KL.** Red wolf (*Canis rufus*) sperm quality and quantity is affected by semen collection method, extender components, and post-thaw holding temperature. *Theriogenology*, v.116, p.41–48, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.05.007>>.
- Gañán N, Gomendio M, Roldan ERS.** 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.
- Hori T. et al.** Influence of different methods of collection from the canine epididymides on post-thaw caudal epididymal sperm quality. *Journal of Veterinary Medical Science*, v.77, n.5, p.625–630, 2015.
- Hori T. et al.** Role of prostatic fluid in cooled canine epididymal sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, n.4, p.655–660, 2017.
- Iglesias GA. et al.** Coleta de sêmen em *Leopardus guttulus* pelo método do cateterismo uretral. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.72, n.3, p.836–842, maio 2020. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352020000300836&tlng=pt>.
- Iranpour FG, Valojerdi MR.** The epididymal sperm viability, motility and DNA integrity in dead mice maintained at 4–6°C. *Iranian Journal of Reproductive Medicine*, v.11, n.3, p.195–200, 2013.
- Korochkina E. et al.** Effect of prostatic fluid on the quality of fresh and frozen-thawed canine epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v.82, n.9, p.1206–1211, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.06.024>>.
- Kuczmariski A H. et al.** Urethral catheterization after pharmacological induction for semen collection in dog. *Theriogenology*, v.153, p.34–38, set. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X20302648>>.
- Kutzler MA.** Semen collection in the dog. *Theriogenology*, v.64, n.3, p.747–754, 2005.
- Macdonald A, Mcgrath JC.** The distribution of adrenoceptors and other drug receptors between the two ends of the rat vas deferens as revealed by selective agonists and antagonists. *British Journal of Pharmacology*, v.71, n.2, p.445–458, 1980.
- Martins MIM. et al.** Fertilizing capacity of frozen epididymal sperm collected from dogs. *Reproduction in Domestic Animals*, v.44, n.SUPPL. 2, p.342–344, 2009.
- Martins MIM. et al.** Comparison of Two Different Extenders for Cryopreservation of Epididymal Dog Sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, v.47, n. SUPPL. 6, p.293–294, 2012.
- McDonnell SM, Odian MJ.** Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology*, v.41, n.5, p.1005–1010, jan. 1994. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X05800238>>.
- Nagashima JB, Songsasen N.** Canid reproductive biology: Norm and unique aspects in strategies and mechanisms. *Animals*, v.11, n.3, p.1–23, 2021.
- Paz RCR.** *Reprodução de Felinos Domésticos e Selvagens*. 1th ed. Cuiabá:EdUFMT, 2013.



- Prochowska S. et al.** Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats—A retrospective study of 214 cases. *Theriogenology*, v.84, n.9, p.1565–1571, dez. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X15004288>>.
- Prochowska S, Nizański W, Partyka, A.** Comparative analysis of in vitro characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (*Felis domesticus*). *Theriogenology*, v.86, n.8, p.2063–2072, 2016.
- Romagnoli N. et al.** Non-invasive evaluation of the haemodynamic effects of high-dose medetomidine in healthy cats for semen collection. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, v.18, n.4, p.337–343, 2016.
- Songsasen N, Tong J, Leibo SP.** 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.
- Swanson W, Bateman H, Vansandt L.** Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reproduction in Domestic Animals*, v.52, p.255–260, abr. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/rda.12863>>.
- Turner RM, McDonnell SM, Hawkins JF.** Use of pharmacologically induced ejaculation to obtain semen from a stallion with a fractured radius. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 206, n.12, p.1906–1908, 1995.
- Varesi S. et al.** Quality of canine spermatozoa retrieved by percutaneous epididymal sperm aspiration. *Journal of Small Animal Practice*, v.54, n.2, p.87–91, 2013.
- Zambelli D. et al.** Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology*, v.68, n.5, p.796–803, 2007.
- Zambelli D. et al.** Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.69, n.4, p.485–490, mar. 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0093691X07006346>>.
- Zambelli D. et al.** Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology*, v.74, n.8, p.1396–1402, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.011>>.
-