

ALGUNS PARÂMETROS DE VIABILIDADE DE ESPERMATOZÓIDES EQUÍNOS COLHIDOS POR VAGINA ARTIFICIAL E POR LAVAGEM DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

(Some viability parameters from equine spermatozoa harvested by artificial vagina and by epididymal tail washing)

MURADÁS, P.R.¹; WEISS, R.R.²; KOZICKI, L.E.³; GRANEMANN, L.C.⁴; SANTOS, I.W.⁵; PIMPÃO, C.T.⁶

¹Mestranda do curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR;

²Departamento de Medicina Veterinária, Setor de Ciências Agrárias, UFPR;

³Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, UFPR;

⁴Médico Veterinário Autônomo, UFPR;

⁵UFPR, Palotina-PR;

⁶PUCPR, Campus São José dos Pinhás-PR.

RESUMO – Neste experimento foram utilizados 10 garanhões com o objetivo de avaliar alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides colhidos mediante vagina artificial antes da orquiectomia, bem como proceder a comparação com os espermatozóides colhidos mediante lavagem da cauda epididimária, após submeter os animais à orquiectomia bilateral. Relativamente às células espermáticas constituíram-se três grupos: 1. o colhido com vagina artificial (VA); 2. o colhido do epidídimo esquerdo; 3. e o colhido do epidídimo direito. Os parâmetros pesquisados para a avaliação da viabilidade espermática à temperatura ambiente (cerca de 22°C) foram: teste de resistência a 5°C do sêmen colhido com vagina artificial (grupo 1), motilidade total, motilidade progressiva, vigor e patologias de acrossoma (todos os grupos). Os seguintes resultados foram obtidos: a motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides colhidos com VA diferiram ($p < 0,05$) dos colhidos dos epidídimos; estes mesmos parâmetros não apresentaram diferença entre os epidídimos direito e esquerdo. Os defeitos de acrossoma dos espermatozóides não apresentaram diferença significativa entre os grupos.

Palavras-chave: epidídimo; espermatozóides; orquiectomia; garanhão; sêmen.

ABSTRACT – In the present experiment, 10 sires had been used with the objective to evaluate some parameters of spermatid viability from sperm collected either by artificial vagina or by epididymis tail washing. The collected semen was separated in three groups: a) the harvested with artificial vagina; b) the collected by the washing of the left epididymal tail; c) the sample collected by the washing of the right epididymal tail. The parameters considered for the evaluation of the spermatid viability were: resistance test at 5°C of the spermatozoa harvested with artificial vagina; total motility; gradual motility; vigor; acrosoma pathologies (all groups). It has been found that the spermatozoa harvested with artificial

vagina differ significantly ($p < 0.05$) from the epididymal harvested spermatozoa. No differences have been found between the behaviour of spermatozoa from the right and the left epididymis.

Key-words: epididymis; semen; spermatozooids; stallion; orchietomy.

Introdução

O reprodutor, como um dos fatores imprescindíveis na cadeia da produção animal, deve apresentar eficiente potencial de fertilidade “*in vitro*” e “*in vivo*”, variando de indivíduo para indivíduo em função da qualidade do sêmen (BELLIN *et al.*, 1998).

A recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo é uma técnica importante para se preservar reservas genéticas de animais valiosos recém mortos. Os espermatozóides, para realizarem a função de fecundar o oócito, devem se apresentar morfológica e funcionalmente normais, características originadas no testículo, quando da espermatogênese, em curso (NISHIMUNE e OKABE, 1993), e completados na passagem pelo epidídimo (maturação) e no contato com as secreções das glândulas anexas.

Nos mamíferos, o epidídimo possui diversas funções, ressaltando-se a reabsorção dos fluídos dos túbulos seminíferos, promovendo a concentração do sêmen, o transporte dos espermatozóides, a eliminação dos espermatozóides defeituosos, a maturação e o armazenamento dos espermatozóides. A função de armazenamento é ilustrada pelo fato dos espermatozóides ejaculados sobreviverem por 24 horas ou mais fora do epidídimo; entretanto os que são mantidos na cauda do epidídimo (*in vivo*) permanecem vivos por mais de 15 dias. Esta funcionalidade é baseada na manutenção do metabolismo com baixa atividade, prevenindo a ativação prematura dos espermatozóides; durante o período de armazenamento o epidídimo acumula espermatozóides suficientes para a cópula. O volume da cauda do epidídimo reflete a capacidade de armazenamento de espermatozóides do macho. Em touros e garanhões o número de

espermatozoides armazenados na cauda do epidídimo pode ser suficiente para até 10 ejaculações sucessivas dependendo da idade, tamanho e atividade reprodutiva do animal (BEDFORD, 1994).

Com o incremento da inseminação artificial (IA) em eqüinos, o processo de diluição, criopreservação e descongelamento do sêmen, em presença ou não do plasma seminal, pode-se minimizar as perdas de material genético, quando um reprodutor de significativo valor genético for a óbito e dele não se possuir material genético anteriormente criopreservado (MAXWELL e JOHNSON, 2000).

Em função da possibilidade de ocorrer morte súbita de reprodutores valiosos de qualquer espécie e anteendo-se a colheita da última possível fração de espermatozoides, objetivou-se neste experimento, avaliar a durabilidade da fertilidade de espermatozoides obtidos da cauda do epidídimo, bem como as diferenças relativas aos parâmetros de viabilidade de espermatozoides colhidos mediante a vagina artificial antes da orquiectomia e os espermatozoides colhidos mediante lavagem da cauda epididimária após a orquiectomia mantidos à temperatura ambiente (cerca de 22^o C).

Materiais e Métodos

Animais: Foram utilizados 10 garanhões totalizando 19 epidídimos, (um dos garanhões era criptorquida unilateral), com idade entre 24 e 90 meses, sendo um da raça Lusitana, dois da Pônei, dois da Crioula, dois mestiços com Puro Sangue Inglês, dois da Apaloosa e um da Mangalarga, oriundos de criatórios de Curitiba e Região Metropolitana. Os animais utilizados no experimento foram alojados no Hospital Veterinário da Universidade Federal do Paraná, em baias individuais e alimentados com concentrado comercial contendo 13% de proteína bruta, 10% de fibras totais, 1,5% de Ca e 0,5% de P, feno de *Coast Cross* e água *ad libitum* durante todo o experimento.

Colheita de sêmen com vagina artificial: A colheita de sêmen foi realizada semanalmente, com vagina artificial modelo Hannover, sendo realizada no mínimo duas colheitas de cada garanhão antes da orquiectomia.

Teste de resistência a 5°C: Logo após a colheita procedeu-se a uma diluição inicial do sêmen com diluente comercial (Botu-Crio®), à base de 1:1 foi submetido ao teste de resistência a 5°C. Durante o teste de resistência foram feitas avaliações de motilidade total, motilidade progressiva e vigor a cada 6 horas e os esfregaços para a avaliação dos defeitos de acrossoma, eram repetidos a cada 24 horas. Este teste da resistência espermática a 5°C foi executado, para verificar se os animais do experimento encaixavam-se dentro dos parâmetros aceitáveis de viabilidade.

Colheita dos espermatozoides da cauda dos epidídimos: Os epidídimos foram obtidos uma semana após a última colheita de sêmen com a vagina artificial, quando os garanhões foram submetidos à orquiectomia bilateral. Os epidídimos após a orquiectomia eram mantidos à temperatura ambiente de cerca de 22^o C até o início da avaliação dos espermatozoides.

A técnica de colheita dos espermatozoides da cauda do epidídimo baseou-se nos relatos de GARDE *et al.* (1994) com modificações e realizada da seguinte maneira: o complexo testículo-epidídimo foi separado em duas partes: testículo e cauda do epidídimo, sendo feita uma lavagem externa da cauda do epidídimo com soro fisiológico pré-aquecido (37°C), para remoção do sangue. O tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo foi removido por dissecação cuidadosa evitando-se o rompimento dos vasos sanguíneos e do ducto epididimário. Após a remoção dos tecidos, foram desfeitos os contornos do ducto epididimário, que formavam a cauda do mesmo. Em seguida, o ducto epididimário foi segmentado em três partes para facilitar a lavagem e a colheita dos espermatozoides, tendo cada segmento de 20 a 40 centímetros, dependendo do tamanho da cauda do epidídimo. Para realização da lavagem, as duas extremidades do segmento eram pinçadas (pinças de Kelly) afim de evitar o extravasamento dos espermatozoides. Na seqüência o segmento era mantido em posição vertical, sobre um filtro acoplado a um copo coletor pré-aquecido (37°C); em seguida retirava-se a pinça da extremidade inferior e injetava-se o diluente no lúmen do mesmo, com auxílio de uma seringa e agulha (0,45 X 13), imediatamente abaixo da pinça superior remanescente, fazendo com que os espermatozoides fossem carregados pelo diluente e recuperados na outra extremidade.

A lavagem de cada cauda epididimária foi feita com 10 mL do diluente pré-aquecido a 37°C. Após o término da lavagem, os espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo foram submetidos ao mesmo processo a que foram submetidos os colhidos com a vagina artificial para avaliação dos parâmetros de viabilidade espermática, à exceção do teste de resistência a 5°C, conforme justificado acima.

Parâmetros de avaliação da viabilidade espermática: Após a colheita com a vagina artificial, durante o teste de resistência a 5°C e após a lavagem luminal dos ductos da cauda do epidídimo, os espermatozoides foram avaliados colocando-se uma gota do complexo sêmen mais diluente em uma lâmina de vidro e coberta por uma lamínula, pré-aquecidas a 37°C, para avaliação da motilidade total e motilidade progressiva dos espermatozoides, realizada em microscopia óptica¹, em aumento de 200 vezes, e registrada em dados percentuais. A determinação da intensidade do movimento dos espermatozoides (vigor) foi também realizada em microscopia óptica, em aumento de 200 vezes, atribuindo-se escala de 0 a 5, entre os valores

¹Olympus – BH-2 – Japão.

mínimos e máximos observados, respectivamente segundo critérios propostos pelo COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL (1998).

Para avaliação da integridade de acrossoma foram feitos esfregaços com os espermatozóides diluídos tanto do sêmen colhido com a vagina artificial quanto dos espermatozóides colhidos da cauda dos epidídimos. Os esfregaços foram corados com vermelho congo e violeta de genciana como descrito por CEROVSKY (1976), e a porcentagem dos defeitos de acrossoma (destacado, em destacamento, rugoso, heterogêneo dentre outros), foi obtida pela contagem de 100 células espermáticas em microscópio de contraste de fase² em objetiva de imersão.

Os resultados foram submetidos ao tratamento estatístico do teste de Fisher ao nível de 5%.

Resultados e Discussão

Após a colheita do sêmen com a vagina artificial, o mesmo foi diluído e submetido ao teste de resistência a 5°C, para se avaliar o decréscimo da viabilidade espermática ao longo do tempo como demonstra a TABELA 1. A linha tracejada demonstra que estes animais apresentavam viabilidade aceitável de até 42 horas pós colheita, ou seja motilidade progressiva acima de 30%. Após alcançarem este mínimo, foram submetidos a orquiectomia sete dias após a última colheita de sêmen.

TABELA 1 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE MOTILIDADE TOTAL, MOTILIDADE PROGRESSIVA E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES COLHIDOS COM VAGINA ARTIFICIAL RELATIVAMENTE AO TEMPO NO TESTE DE RESISTÊNCIA A 5°C (n=10) 2006.

Horas pós-início do teste de resistência a 5°C	Média da Motilidade Total (%) dos Espermatozóides	Média da Motilidade Progressiva (%) dos Espermatozóides	Média do Vigor (escala 0 a 5) dos Espermatozóides
6	78,5 ^a	62 ^a	4,5 ^a
12	73 ^{ab}	57,5 ^{ab}	3,9 ^{ab}
18	68 ^{abc}	50 ^{bc}	3,5 ^{bc}
24	63 ^{abcd}	43,5 ^{cd}	2,9 ^{cd}
30	61 ^{bcd}	40 ^{cde}	2,7 ^{cde}
36	57,5 ^{bcd}	36,5 ^{de}	2,5 ^{de}
42	54,5 ^{cde}	33,5 ^{def}	2,2 ^{def}
48	50,5 ^{de}	29,5 ^{efg}	1,9 ^{efg}
54	41,5 ^{ef}	23 ^{fgh}	1,6 ^{fg}
60	39 ^{ef}	19,5 ^{ghi}	1,4 ^{fgh}
66	29 ^{fg}	14,5 ^{hij}	1,2 ^{ghi}
72	23 ^{gh}	11 ^{ij}	1,1 ^{ghi}
78	17,5 ^{gh}	9,5 ^{ij}	0,7 ^{hi}
84	17,5 ^{gh}	9 ^{ij}	0,7 ^{hi}
90	12,5 ^h	7 ^j	0,5 ⁱ
96	12 ^h	6,5 ^j	0,5 ⁱ

^{a b c d e f g h i j} Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores diferem entre si pelo teste Fisher (p< 0,05). Linha tracejada indica o limite de tempo de viabilidade espermática de 42 horas.

Na TABELA 2 observa-se que os valores de motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides colhidos com vagina artificial diferem significativamente dos valores dos epidídimos esquerdo e direito, porém entre os dois epidídimos, não houve diferenças. SILVA *et al.* (2003), comparando o sêmen em ejaculado e espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo de touros nelore, observaram que a motilidade total dos espermatozóides do ejaculado era significativamente maior do que a do epidídimo, corroborando os resultados deste experimento.

Os percentuais de defeitos de acrossoma, como pode ser observado na TABELA 2, não apresentaram diferença entre os três grupos. BRIZ *et al.* (1996)

verificaram as malformações espermáticas em diferentes regiões do epidídimo (cabeça, corpo e cauda) de reprodutores suínos sexualmente maduros a fim de determinar a origem das mesmas e observaram diferenças entre a frequência de alguns tipos de defeitos e a região de origem no epidídimo. Outros defeitos eram distribuídos uniformemente ao longo do epidídimo. Segundo os autores supracitados os defeitos de origem secundária aumentam na cauda do epidídimo, e os de origem primária, com exceção da cauda dobrada, são constantes ao longo do epidídimo.

Existe uma relação entre o percentual de motilidade progressiva dos espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo e as horas pós-orquiectomia, como é observado na TABELA 3.

²Olympus-BX41TF – Japão.

TABELA 2 – COMPARAÇÃO DAS MÉDIAS DE MOTILIDADE TOTAL, MOTILIDADE PROGRESSIVA E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES ENTRE OS GRUPOS DE ESPERMATOZÓIDES DE EQUINOS COLHIDOS COM VAGINA ARTIFICIAL, COM LAVADO DO EPIDÍDIMO ESQUERDO E DIREITO (2006).

Grupos	N	Média da Motilidade Total (%) dos Espermatozóides	Média da Motilidade Progressiva (%) dos Espermatozóides	Média do Vigor (escala 0 a 5) dos Espermatozóides	Patologias de Acrossoma (%)
Vagina Artificial	10	73 ^a	58 ^a	4,4 ^a	7,60 ^a
Epidídimo Esquerdo	10	45,7 ^b	32 ^b	2 ^b	10,40 ^a
Epidídimo Direito	9	38,33 ^b	21,89 ^b	1,67 ^b	7,11 ^a

^{a,b} Letras diferentes na mesma coluna indicam que os valores diferem entre si pelo teste Fisher ($p < 0,05$).

TABELA 3 – PERCENTUAL DA MOTILIDADE TOTAL, MOTILIDADE PROGRESSIVA E VIGOR DOS ESPERMATOZÓIDES DE EQUINOS, COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO E MANTIDOS À TEMPERATURA AMBIENTE, EM RELAÇÃO ÀS HORAS PÓS-ORQUIECTOMIA (2006). (n=19).

ANIMAL	Horas "pós-orquiectomia"	Motilidade Total (%)	Motilidade Progressiva (%)	Vigor (0 a 5)
1 (EE)	1	70	40	2
1 (ED)	2	40	20	2
2 (ED)	3	5	2	1
2 (EE)	4	65	60	3
3 (EE)	5	80	70	3
3 (ED)	6	60	20	1
4 (ED)	7	85	70	4
4 (EE)	10	80	60	4
5 (EE)	12	75	50	1
6 (ED)	14	30	20	2
6 (EE)	16	30	10	2
7 (ED)	18	60	40	2
7 (EE)	20	50	30	2
8 (ED)	22	20	5	1
9 (ED)	24	40	20	1
10 (ED)	24	5	0	1
8 (EE)	26	5	0	1
9 (EE)	36	1	0	1
10 (EE)	36	1	0	1

ED = Epidídimo Direito.
EE = Epidídimo Esquerdo.

O epidídimo direito do animal número dois apresentou valores baixos de motilidade total, motilidade progressiva e vigor devido ao pouco tempo de descida do testículo direito da cavidade abdominal. Este animal possuía 24 meses de idade e estava em fase de desenvolvimento sexual.

No momento da colheita de espermatozóides dos epidídimos, estes apresentavam-se imóveis, porém ocorria a melhoria da motilidade e vigor, após uma hora em contato com o diluente. Este fato é atribuído a que, quando as células espermáticas são recuperadas deste modo, elas estão concentradas e na ausência dos fluidos das glândulas acessórias. Segundo pesquisadores o plasma seminal tem funções de transporte, sustentação e motilidade inicial das células

espermáticas após a ejaculação além de aumentar a longevidade dos espermatozóides (TIPLADY *et al.*, 2002). KATILA *et al.* (2002), demonstraram que os espermatozóides eqüinos colhidos da cauda do epidídimo apresentavam melhoria na motilidade total, progressiva e no vigor, 15 minutos após a adição de plasma seminal, função esta realizada, no presente experimento, pelo diluente Botu-Crio®, ao proporcionar um meio nutritivo adequado, ativando os espermatozóides.

Os valores de motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides epididimários até 24 horas pós-orquiectomia, obtidos nesse experimento, foram semelhantes aos da vagina artificial. Resultados similares foram obtidos por BRUEMMER *et al.* (2002),

Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides equinos colhidos por vagina artificial...

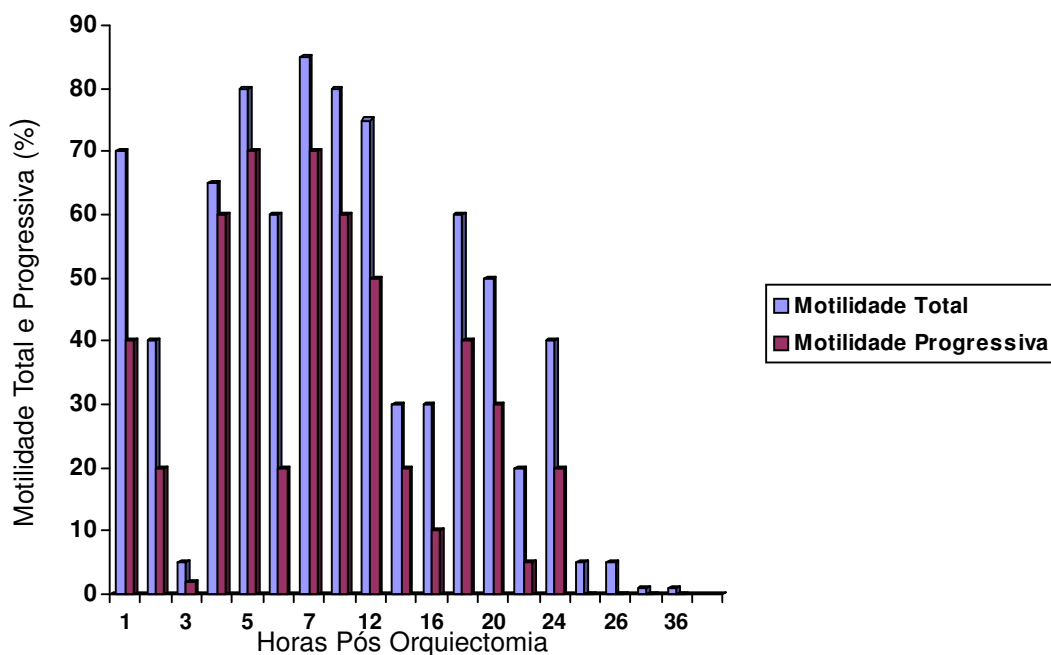
JAMES *et al.* (2002), KATILA *et al.* (2002) e TIPLADY *et al.* (2002), ao trabalharem com espermatozóides recuperados de epidídimos equinos armazenados a 4°C.

Como esperado, observou-se um declínio da qualidade espermática com o aumento do tempo pós-orquiectomia (FIGURA 1), tendo-se como limite de viabilidade, próximo das 24 horas. Este decréscimo não é devido somente ao envelhecimento e esgotamento metabólico dos espermatozóides, mas também é inerente ao processo de degeneração tecidual pós-

orquiectomia.

Pesquisadores ao trabalharem com outras espécies animais, como CHRISTIAN *et al.* (1993) e KISHIKAWA *et al.* (1999) em ratos, GARDE *et al.* (1994) em caprinos, KAABI *et al.* (2003) em ovinos, demonstraram que espermatozóides epididimários viáveis podem ser recuperados de epidídimos armazenados à temperatura ambiente por até 24 horas, corroborando os valores encontrados no presente experimento, executado em equinos.

FIGURA 1 – RELAÇÃO ENTRE O PERCENTUAL DE MOTILIDADE TOTAL E MOTILIDADE PROGRESSIVA DOS ESPERMATOZÓIDES DE EQUINOS, COLHIDOS DA CAUDA DO EPIDÍDIMO (DIREITO E ESQUERDO) À TEMPERATURA AMBIENTE E AS HORAS PÓS-ORQUIECTOMIA (2006).



De todos os epidídimos após as 24 horas obteve-se espermatozóides com qualidade significativamente inferior ao obtido com os colhidos com a vagina artificial. SONSASEN *et al.* (1998), trabalhando com ratos demonstraram que as degenerações dos túbulos epididimários começam a afetar os espermatozóides epididimários, próximo das 24 horas *post-mortem*, tempo condizente com os valores encontrados neste experimento, pois a partir das 24 horas ocorreu diminuição acentuada da qualidade das células espermáticas epididimárias.

O limite de 24 horas para a colheita de espermatozóides de epidídimos armazenados à temperatura ambiente com motilidade e vigor semelhantes ao da vagina artificial verificado nesse experimento, é bastante inferior ao encontrado por JAMES *et al.* (2002) em garanhões, GARDE *et al.* (1998) em cervídeos, SANKAI *et al.* (2001) em ratos e YU e LEIBO (2002) em cães, ao recuperarem espermatozóides epididimários viáveis por até 96 horas pós-orquiectomia. Estes valores são muito superiores aos encontrados no presente experimento, porque eles

mantiveram os epidídimos refrigerados a 5°C após a orquiectomia. A temperatura mais baixa retarda o processo de degeneração e reduz o metabolismo dos espermatozóides, mantendo-os vivos por mais tempo (JAMES *et al.*, 2002).

Conclusões

Com base nos resultados obtidos nesse experimento conclui-se que:

a) Os espermatozóides colhidos da cauda de epidídimos e mantidos à temperatura ambiente foram considerados viáveis por até 24 horas pós-orquiectomia.

b) Motilidade total, motilidade progressiva e vigor dos espermatozóides colhidos com a vagina artificial, antes da orquiectomia, diferem ($p < 0,05$) dos espermatozóides colhidos dos epidídimos pós-orquiectomia; entretanto esses mesmos parâmetros não diferiram entre os epidídimos direito e esquerdo;

c) Os defeitos de acrossoma dos espermatozóides não apresentaram diferença significativa entre os três grupos.

Referências

- BEDFORD, J.M. The status and the state of the human epididymis. **Human Reproduction**, v.9, p.2187-2199, 1994.
- BELLIN, M.E.; OYARSO, J.N.; HAWINKINS, H.E. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, p.2032-2039, 1998.
- BRIZ, M.D.; BONET, S.; CAMPS, R. Sperm malformations throughout the boar epididymal duct. **Animal Reproduction Science**, v.43, p.221-239, 1996.
- BRUEMMER, J.E.; REGER, H.; ZIBINSKI, G.; SQUIRES, E.L. Effect of storage at 5°C on the motility and cryopreservation of stallion epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.58, p.405-407, 2002.
- CEROVSKY, J. **A new staining procedure for boar spermatozoa**. Zivocisna Vyroba, Prague, 21(5):361-6, 1976.
- CHRISTIAN, C.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S. Presence of motile sperm in mice 24 hours post-mortem. **Theriogenology**, v.39, p.201, 1993.
- COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte, 1998. 49p.
- GARDE, J.; AGUADO, M.; PEREZ, S.; GARRIDO, D.; PEREZ-GUZMAN, M.; MONTORO, V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from post-mortem rams. **Theriogenology**, v.41, p.2003, 1994.
- GARDE, J.; ORTIZ, N.; GARCIA, A.; GALLEGO, L.; LANDETE, C.T.; LOPEZ, A. Post-mortem assessment of sperm characteristics of the red deer during the breeding season. **Archives of Andrology**, v.41, p.195-202, 1998.
- JAMES, A.N.; GREEN, H.; HOFFMAN, S.; LANDRY, A.M.; PACCAMONTI, D.; GODKE, R.A. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. **Theriogenology**, v.58, p.401-404, 2002.
- KAABI, M.; PAZ, P.; ALVAREZ, M.; ANEL, E.; BOIXO, J.C.; ROUISSI, H.; HERRAEZ, P.; ANEL, L. Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermatozoa recovered post-mortem. **Theriogenology**, v.60, p.1249-1259, 2003.
- KATILA, T.; ANDERSSON, M.; REILAS, T.; KOSKINEN, E. Post-thaw motility and viability of fractionated and frozen stallion ejaculates. **Theriogenology**, v.58, p. 241-244, 2002.
- KISHIKAWA, H.; TATENO, H.; YANAGIMACHI, R. Fertility of mouse spermatozoa retrieved from cadavers and maintained at 4°C. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.116, p.217-222, 1999.
- MAXWELL, W.M.C.; JOHNSON, L.A. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma. **Theriogenology**, v.52, p.1273-1280, 2000.
- NISHIMUNE, Y.; OKABE, M. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. **Development and Growth Differentiation**, v.34, p.479-486, 1993.
- SANKAI, T.; TSUCHIYA, H.; Ogonuki, N. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v.55, p.1759-1768, 2001.
- SILVA, A.E.D.F.; DIAS, A.L.; UNANIAN, M.M.; FREITAS, A.R.; BLOCH, C.J. Conteúdo de peptídeos e avaliação morfofisiológica dos espermatozoides do epidídimo e no ejaculado de bovinos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1890-1900, 2003.
- SONSASEN, N.; TONG, J.; LEIBO, S. 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, p.189-196, 1998.
- TIPLADY, C.A.; MORRIS, L.H.A.; ALLEN, W.R. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. **Theriogenology**, v.58, p.225-228, 2002.
- YU, I.; LEIBO, S. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4 °C. **Theriogenology**, v.57, p.1179-1190, 2002.

Recebido para publicação: 09/10/2006
 Aprovado: 21/12/2006