

COLHEITA E PRESERVAÇÃO DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE GARANHÕES RECUPERADAS DA CAUDA DO EPIDIDÍMO

Gabriel Augusto Monteiro¹
Priscilla Nascimento Guasti¹
Frederico Ozanam Papa²

RESUMO

A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo e sua criopreservação representam um grande avanço biotecnológico, pois esta pode ser a última chance de preservação do material genético quando ocorre morte ou lesão grave em garanhões de alto valor genético. Sabe-se que após a morte os espermatozoides permanecem viáveis no epidídimo por algum tempo até que a decomposição afete sua viabilidade. Normalmente duas técnicas são utilizadas para a colheita de espermatozoides do epidídimo em equinos: flutuação e fluxo retrógrado. Estudos com inseminações na extremidade do corno uterino e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) mostraram valores satisfatórios com sêmen recuperado da cauda do epidídimo. Baseado na possibilidade de colheita e nos resultados de fertilidade, conclui-se que estes espermatozoides podem ser utilizados com êxito em técnicas de reprodução assistida, visando a obtenção de produtos de animais geneticamente superiores. O objetivo do trabalho foi revisar as principais formas de recuperação, preservação e utilização de células espermáticas do epidídimo na espécie equina.

Palavras chave: Garanhão, sêmen, epidídimo, criopreservação, biotecnologia

COLLECTION AND PRESERVATION OF SPERM HARVESTED FROM THE EQUINE EPIDIDYMAL CAUDA

ABSTRACT

The recovery of spermatozoa from the epididymal cauda and its cryopreservation represents a great technological advance, since it is the last possibility to preserve genetic material from dead or deceased valuable males. It is known that after death, spermatozoa remain viable in the epididymis for some time until decomposition affects its viability. Two recovery techniques are commonly used in equine epididymal sperm: flotation and retrograde flush. Studies in both deep uterine and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) with cryopreserved semen obtained from cauda epididymis have shown satisfactory results. Based on the possibility of harvest and fertility results, we can conclude that these spermatozoa can be used in artificial reproduction techniques, in order to obtain products from genetic valuable animals. The aim of the present study was to review the main techniques of recovery, preservation and use of epididymal sperm in horses.

Keywords: Stallion, semen, epididymis, cryopreservation, technology

¹ Mestrando do programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Departamento de Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, São Paulo – “Bolsista Fapesp” E-mail: gamufvet@yahoo.com.br. Autor para correspondência, cel 9658-9807

² Professor Titular, Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, FMVZ/UNESP, Botucatu, São Paulo.

COLECTA Y PRESERVACIÓN DE CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE SEMENTALES RECUPERADAS DE LA COLA DEL EPIDÍDIMO

RESUMEN

La recuperación de los espermatozoides de la cola del epidídimo y la criopreservación es un avance importante de la biotecnología, ya que esto puede ser la última oportunidad para recuperar el material genético, cuando hay la muerte o lesiones graves en sementales de alto valor genético. Se sabe que después de la muerte, los espermatozoides en el epidídimo permanecen viables durante un tiempo hasta que la descomposición afecta a la viabilidad. Normalmente dos técnicas son utilizadas para la colecta de espermatozoides del epidídimo en equinos: fluctuación y flujo retrógrado. Estudios realizados con inseminaciones en la punta del cuerno uterino y con inyección intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) mostraron resultados satisfactorios utilizando semen recuperado de la cola del epidídimo. Basado en la posibilidad de colecta y en los resultados de fertilidad, se concluye que estos espermatozoides pueden ser utilizados con éxito en técnicas de reproducción asistida, con el fin de obtener productos de animales genéticamente superiores. El objetivo fue revisar las principales formas de recuperación, preservación y el uso de células de espermatozoide de la especie equina en el epidídimo.

Palabras-clave: Semental, semen, epidídimo, criopreservación, biotecnología

1. INTRODUÇÃO

A morte inesperada ou ferimento grave que impossibilite a cobertura ou colheita de sêmen pode terminar prematuramente com a vida reprodutiva de garanhões de alto valor genético. Nesses casos, muitos proprietários têm buscado uma colheita final de sêmen na tentativa de obter mais produtos com a genética valiosa daquele garanhão.

Ao longo dos anos muitas técnicas para colheita e criopreservação de sêmen foram desenvolvidas, no entanto poucas pesquisas foram realizadas para recuperação de células espermáticas de garanhões terminais.

A eletroejaculação é uma técnica utilizada com êxito em algumas espécies como bovinos e ovinos, porém sua utilização em equinos terminais é desanimadora, pelos riscos traumáticos tanto para o animal quanto para o operador (1) e pela contaminação do sêmen com urina, inviabilizando sua utilização (2).

A recuperação de espermatozoides viáveis do epidídimo e sua criopreservação pode ser utilizada para preservação de germoplasma de animais de alto valor genético. Estudos em equinos demonstram que estes espermatozoides à temperatura ambiente são considerados viáveis até 24 horas pós orquiectomia (3), estes podem ser usados em inseminações artificiais (4) e ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide) (5), com sêmen fresco ou congelado, resultando em prenhez (4,6,7). Além disso, um estudo recente mostra que o número total de espermatozoides colhidos da cauda do epidídimo são superiores a sêmen colhido em vagina artificial (3).

O sucesso com a comprovação da fertilidade destes espermatozoides na espécie equina, mostra a importância de estudos testando protocolos de recuperação e criopreservação destes espermatozoides, bem como técnicas de inseminação e outras biotecnologias que utilizem baixo número de espermatozoides (IA e ICSI), visando um melhor aproveitamento do sêmen. O presente trabalho teve por objetivo revisar as principais formas de recuperação, preservação e utilização de células espermáticas do epidídimo na espécie equina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Além da grande incidência de mortes inesperadas na espécie equina, decorrentes de doenças gastrintestinais (8) e hemorragias pulmonares em animais de corrida, os acidentes traumáticos graves e processos obstrutivos podem também interromper prematuramente a vida reprodutiva de garanhões de alto valor genético, por impossibilitar a colheita de sêmen ou monta natural.

Com o incremento da inseminação artificial, criopreservação e descongelamento do sêmen equino, é possível minimizar perdas do material genético de garanhões de alto valor que forem a óbito com a recuperação e preservação (criopreservação) de espermatozoides da cauda do epidídimo (9).

2.1 ESPERMATOGÊNESE

Espermatogênese é um processo de divisão e diferenciação, pelos quais os espermatozoides são produzidos nos túbulos seminíferos. O epitélio seminífero é composto basicamente por células de Sertoli e germinativas em desenvolvimento (10,11). O processo de multiplicação e diferenciação nos estágios mais avançados de desenvolvimento das células germinativas está sincronizado com as mudanças morfológicas e a expressão gênica nas células de Sertoli e Leydig (12,13).

As espermatogônias estão localizadas na porção basal do epitélio seminífero e são sustentadas pelas células de Sertoli (10). As espermatogônias dividem-se várias vezes por mitose originando os espermatócitos, que por meiose seguida de mitose, formam quatro espermátides. Posteriormente estas sofrerão modificações progressivas originando os espermatozoides, sendo esta última etapa denominada espermiogênese (11).

Ao final da espermatogênese os espermatozoides são liberados no lúmen dos túbulos seminíferos (10,11), nesta fase estes possuem flagelo, porém estas células ainda são imóveis e inférteis (14).

2.2 MATURAÇÃO ESPERMÁTICA

À medida que os espermatozoides passam pelo epidídimo eles sofrem importantes alterações morfofuncionais importantes (14). O epidídimo é um órgão alongado enovelado localizado na superfície do testículo (15). Pode ser dividido anatomicamente em três segmentos: a cabeça, onde há absorção de fluidos (16) e aquisição de motilidade progressiva pelos espermatozoides (17); o corpo, onde os espermatozoides passam a apresentar capacidade fecundante; e por último a cauda, cuja função básica é armazenamento e manutenção de espermatozoides maduros (17).

Antigamente acreditava-se que para maturação espermática e capacidade fecundante ocorrerem, apenas um tempo específico era necessário (18). No entanto, Orgebim-Crist (19) relatou que além do tempo demandado era indispensável a interação com diversas substâncias em diferentes regiões do epidídimo para que os espermatozoides adquirissem capacidade de fecundação. Para isso, os espermatozoides necessitam apresentar características morfofuncionais normais, características estas, adquiridas em sua formação nos túbulos seminíferos e completadas com a passagem pelo epidídimo e contato com secreções das glândulas anexas (20). Além do desenvolvimento da motilidade os espermatozoides no epidídimo sofrem estabilização da peça intermediária e acrossoma (14).

Os efeitos fisiológicos da aquisição de macromoléculas no epidídimo não são completamente elucidados, mas são requeridos para o desenvolvimento de motilidade e

capacidade fecundante (21). Esta hipótese é sustentada por estudos que apresentaram melhores taxas de fertilização, utilizando espermatozóides colhidos da cauda do epidídimo quando comparado a amostras colhidas da cabeça e do corpo epididimário (18,19,22).

Após a maturação dos espermatozóides eles são armazenados na cauda do epidídimo. O número de espermatozóides armazenados varia de acordo com o padrão reprodutivo, acasalamento e comportamento social de uma determinada espécie (23). Os espermatozóides, ao saírem do epidídimo, recebem secreções das glândulas anexas que os confere capacidade de ligação à zona pelúcida e reação acrossômica (24).

O plasma seminal parece ser essencial na cobertura natural servindo como transportador e protetor de espermatozóides, no entanto sua função é questionável, visto que trabalhos utilizando sêmen da cauda do epidídimo acrescido ou não do plasma seminal não diferiram significativamente (4,25,26,27,28).

2.3 COLHEITA DE SÊMEN EM GARANHÕES TERMINAIS

O sêmen de garanhões terminais pode ser obtido pelas técnicas de eletroejaculação (2), ejaculação química (29,30) e colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo (3,7,25,31,32).

2.3.1 Eletroejaculação

Segundo Cary et al. (2) a eletroejaculação não é uma técnica eficiente em obter espermatozóides viáveis em equinos, pois mesmo quando a ejaculação foi conseguida, a contaminação por urina inviabilizou a utilização do sêmen. Neste mesmo experimento, foram obtidos espermatozóides viáveis da cauda do epidídimo.

2.3.2 Ejaculação química

Ejaculação química é um método de colheita que pode ser utilizado em animais com problemas de ejaculação (33) ou animais impossibilitados de realizar cobertura ou colheita de sêmen no manequim. Os principais compostos utilizados nestes estudos são: xilazina (29,30,33,34,35), imipramina (29,30,33,34,35) e prostaglandina (34).

No entanto, os estudos até agora desenvolvidos incluem uma variedade de doses, protocolos, vias de administração, combinações de agentes e procedimentos de pré-tratamento, apresentando taxas de ejaculação entre 30-75% das tentativas (30).

2.3.3 Colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo

A colheita de sêmen da cauda do epidídimo em garanhões mostrou-se eficiente em recuperar células espermáticas (3,7,25,31) e estes espermatozóides apresentam motilidade progressiva igual ou superior a espermatozóides colhidos com vagina artificial, embora, após a congelamento e descongelamento estes espermatozóides apresentem fertilidade inferior quando comparados com espermatozóides do ejaculado (25).

Estudos realizados com sêmen epididimário em felinos, caninos, caprinos, suínos, equinos e bovinos, demonstraram que a maioria destas espécies possui melhor viabilidade seminal quando os testículos são armazenados entre 4 e 5°C, comparados com os mantidos à temperatura ambiente (32). À temperatura ambiente, observou-se um declínio da qualidade espermática com o aumento do tempo, tendo como limite de viabilidade próximo das 24 horas pós-orquiectomia. Este decréscimo pode não somente ser explicado devido ao

envelhecimento e esgotamento metabólico dos espermatozóides, mas também inerente ao processo de degeneração tecidual pós-morte. Temperaturas mais baixas retardam o processo de degeneração e diminuem o metabolismo dos espermatozóides, mantendo-os vivos por mais tempo (9).

2.3.4 Métodos de recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo

Existem cinco métodos básicos para recuperação de espermatozóides do epidídimo. Normalmente três técnicas são utilizadas para colheita de espermatozóides de animais mortos e duas são aplicadas a pacientes vivos (36).

2.3.4.1 Métodos utilizados em animais mortos

Método de Flutuação

O método de flutuação consiste em cortar ou fatiar a cauda do epidídimo (Figura 1a e 1b). Várias incisões são realizadas longitudinalmente para expor os espermatozóides ao meio exterior. Posteriormente a cauda do epidídimo é mantida em meio gelatinoso, desta maneira, os espermatozóides migram para o meio (Figura 1c) e são recuperados por filtração (37).

Apesar deste método ser frequentemente aplicado a pequenos animais, devido ao tamanho do epidídimo, esta técnica também pode ser utilizada para recuperação de espermatozóides do epidídimo de grandes animais (36,38).

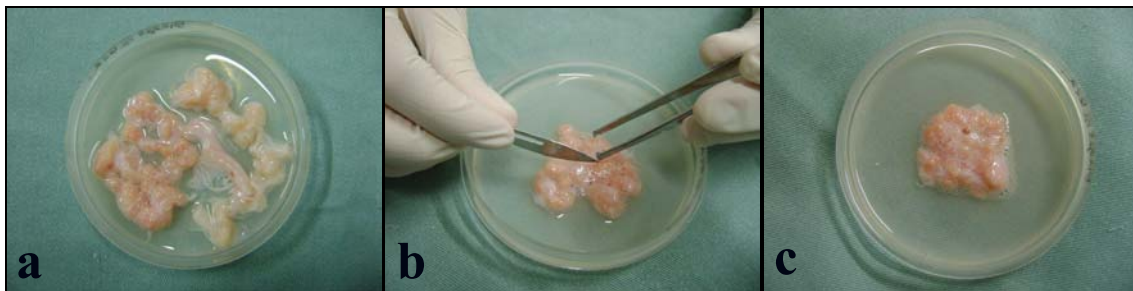


FIGURA 1 – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozóides pela técnica de flutuação consistem: separação da cauda do epidídimo (a); incisões para proporcionar a migração dos espermatozóides no lúmen da cauda do epidídimo e remoção do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (b); repouso para migração dos espermatozóides para o meio (c).

Método de Perfuração

Na técnica de perfuração a cauda do epidídimo é colocada em uma placa de petri e com uma agulha os ductos epididimários são perfurados (39). Posteriormente as amostras são filtradas e centrifugadas para diminuir detritos celulares. Esta técnica proporciona uma elevada taxa de recuperação de espermatozóides, entretanto a viabilidade espermática pode ser afetada devido à exposição à centrifugação e componentes sanguíneos (36).

Fluxo retrógrado na Cauda do Epidídimo

A técnica de fluxo retrógrado na cauda do epidídimo consiste na geração de pressão com uma seringa nos vasos deferentes até que os espermatozóides epididimários carreados pelo diluente extravasem pelo corte realizado na junção entre a cauda e o corpo epididimal (40). A recuperação espermática média com esse método varia de 15 a 20 bilhões de espermatozóides por epidídimo (41).

A técnica de fluxo retrógrado modificada, relatada por Granemann (9), consiste na separação do complexo testículo-epidídimo (Figura 2a), remoção dos tecidos que envolvem o epidídimo a partir da dissecação do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (Figura 2b). Após desfazer os contornos do ducto epididimário (Figura 2c), este deve ser seccionado em três partes para facilitar a lavagem.

Para extrair os espermatozóides do epidídimo o segmento deve ser estendido na posição vertical (Figura 3a, 3b e 3c) e o diluente injetado no lúmen até que os espermatozóides sejam carregados pelo diluente e recuperados na outra extremidade. Com esta técnica o número de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo foi superior quando comparado com os colhidos pela vagina artificial (9).

Em um estudo realizado com cervídeos por Martinez-Pastor et al. (42), comparando método de fluxo retrógrado com o método de flutuação para recuperação de sêmen epididimal, foram observados maiores concentrações quando utilizada a técnica de fluxo retrógrado. Além disso, estas amostras apresentavam menor quantidade de hemácias, o que pode ser considerado outra vantagem no emprego do método de fluxo retrógrado.



FIGURA 2 – Etapas que antecedem a recuperação de espermatozóides pela técnica de fluxo retrógrado consistem: separação do complexo testículo-epidídimo (a); remoção do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo (b); contornos da cauda do epidídimo (c).

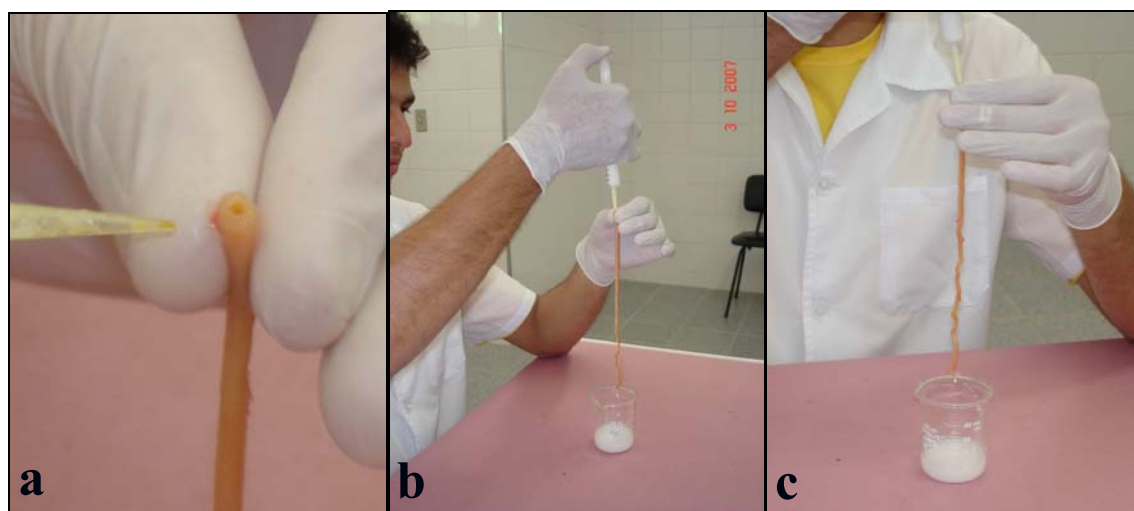


FIGURA 3 – recuperação de sêmen do epidídimo pela técnica de fluxo retrógrado: após a secção do ducto da cauda do epidídimo em três partes ele é estendido na posição vertical e o diluente é injetado no lúmen até a outra extremidade (a,b,c).

2.3.4.2 Métodos utilizados em pacientes vivos

A aspiração microcirúrgica de espermatozóides do epidídimo (MESA) (43,44) e aspiração percutânea de espermatozóides do epidídimo (PESA) (45), normalmente são

aplicadas em pacientes vivos e representam um grande avanço biotecnológico ao combate de infertilidade masculina.

2.4 FERTILIDADE DO SÊMEN DA CAUDA DO EPIDÍDIMO

A primeira prenhez utilizando espermatozóides congelados na espécie equina foi relatada em uma égua inseminada com espermatozóides da cauda do epidídimo (6). No entanto, apesar de comprovada a fertilidade destes espermatozóides, os estudos com sêmen equino limitaram-se à preservação de sêmen do ejaculado.

Somente nos últimos anos, alguns pesquisadores intensificaram o estudo na recuperação e preservação de espermatozóides viáveis da cauda do epidídimo (3,4,5,7,25,28,31,32,41,46,47). Parte deste empenho foi promovida pelo crescente interesse na preservação de espécies ameaçadas de extinção e preservação de células espermáticas de animais de produção de alto valor genético.

Os estudos com espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo concentram-se no efeito da adição de plasma seminal (26-28), comparação de meios diluentes adequados para congelamento (7,47) e viabilidade espermática após armazenamento do testículo (31).

Morris (4) relatou recentemente que inseminações histeroscópicas utilizando sêmen da cauda do epidídimo obtiveram 45% de éguas gestantes quando 200×10^6 espermatozóides do epidídimo foram inseminados a fresco. Utilizando a mesma dose inseminante com sêmen congelado-descongelado, obtiveram 18 e 8% de concepção quando as éguas foram inseminadas por histeroscopia e método convencional, respectivamente. Isso mostra que é possível a obtenção de produtos com sêmen de epidídimo mesmo com uma baixa dose inseminante.

Papa et al. (7), comprovaram a fertilidade do sêmen epididimário criopreservado de garanhões com a utilização do diluente Botu-Crio®, obtendo taxa de concepção de 66,6% em éguas inseminadas no ápice do corno com 400×10^6 espermatozóides viáveis pré e pós inseminação. Esta taxa de concepção foi maior do que os estudos anteriores com sêmen fresco (4) ou congelado (4,6).

Heise et al. (48) compararam a taxa de concepção de espermatozóides recuperados do epidídimo crescidos ou não de plasma seminal. Neste estudo, diferentemente de achados anteriores (4,28), demonstrou vantagem na capacidade fecundante dos espermatozóides após adição de plasma seminal.

Em um estudo realizado por Herrera et al. (5) utilizando ICSI e em oócitos equinos maturados *in vitro*, não apresentou diferença na proporção de clivagem embrionária quando comparado o sêmen criopreservado da cauda do epidídimo ao sêmen fresco e criopreservado do ejaculado. Estes resultados demonstram que sêmen criopreservado da cauda do epidídimo pode ser utilizado satisfatoriamente na ICSI em eqüinos, corno uterino e por histeroscopia.

A recuperação de espermatozóides do epidídimo é a última chance para preservação espermática de garanhões que possam vir a óbito. Portanto, a utilização de métodos de inseminação na extremidade do corno uterino e por histeroscopia torna-se importante, pois tem a capacidade de melhorar a taxa de concepção (4,26) com utilização de menor número de espermatozóides por inseminação, visando o melhor aproveitamento do sêmen estocado.

3. CONCLUSÃO

A colheita de espermatozóides da cauda do epidídimo visa à recuperação de células espermáticas de garanhões de alto valor genético que forem a óbito, eutanasiados, submetidos à orquiectomia bilateral de emergência, como nos casos de hérnia inguino-escrotal ou animais gravemente traumatizados e impossibilitados de realizarem cobertura.

Sabe-se que após a morte de garanhões os espermatozóides permanecem viáveis por algum tempo até que haja o início da decomposição, possibilitando a recuperação espermática do epidídimo mesmo após a morte do garanhão.

Baseado na possibilidade de colheita e nos resultados de fertilidade pode-se concluir que os espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo podem ser utilizados com êxito em biotecnologias da reprodução, como inseminações artificiais e ICSI. Este processo possibilita a utilização de sêmen fresco ou preservá-lo (criopreservação) para uso futuro, visando à obtenção de produtos de animais geneticamente superiores.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Stover J, Seager SWJ, Dolensk EP, Doherty J, Wildt DF, Platz CC. Electroejaculation and semen evaluation of the Przewalski horse (*Equus przewalski*). Am Assoc Zoo Vet. 1981;144-145.
2. Cary JA, Madill S, Farnsworth K, Hayna JT, Duoos L, Fahning ML. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallions. Can Vet J. 2004;45:35-41.
3. Muradás PR, Weiss RR, Kozicki LE, Granemann LC, Santos IW, Pimpão CT. Alguns parâmetros de viabilidade de espermatozóides equinos colhidos por vagina artificial e por lavagem da cauda do epidídimo. Arch Vet Sci. 2006;11:69-74.
4. Morris L, Tiplady C, Allen WR. The in vivo fertility of cauda epididymal spermatozoa in the horse. Theriogenology. 2002;58:643-6.
5. Herrera C, Miragaya HM, Conde P, Hynes V, Losinno L, Quintans C, et al. Intracytoplasmic injection of in vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm. Anim Reprod Sci. 2006;94:299-302.
6. Barker CA, Gandier SCC. Pregnancy in a mare resulting from frozen epididymal spermatozoa. Can J Comp Med. 1957;21:47-51.
7. Papa FO, Melo CM, Fioratti EG, Della'Qua JA, Zahn FS, Alvarenga MA. Freezing of stallion epididymal sperm. Anim Reprod Sci. 2008;107:293-301.
8. Alves GES. Anamnese. In: Forum de gastroenterologia equina, I., 1994, Curitiba, PR. Diagnóstico em cólica equina. Curitiba: Colégio Brasileiro de Cirurgia e Anestesiologia Veterinária, 1994. p.3-16.
9. Granemann LC. Avaliação comparativa do sêmen equino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós-orquiectomia. [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.
10. Johnson L, Blanchard TL, Varner DD, Scrutchfield WL. Factors affecting spermatogenesis in the stallion. Theriogenology. 1997;48:1199-216.
11. Johnson L, Varner DD, Roberts ME, Smith TL, Keillor GE, Scrutchfield WL. Efficiency of spermatogenesis: a comparative approach. Theriogenology. 2000;60:471-80.

12. Anway MD, Li Y, Ravindranath N. Expression of testicular germ cell genes identified by differential display analysis. *J Androl.* 2003;24:173-84.
13. Walker WH. Molecular mechanisms controlling Sertoli cell proliferation and differentiation. *Endocrinology.* 2003;144:3719-21.
14. Barth AD, Oko RJ. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press; 1989. 285p.
15. Sullivan R, Saez F, Girouard J, Frenette G. Role of exosomes in sperm maturation during the transit along the male reproductive tract. *Blood Cells Mol Dis.* 2005;35:1-10.
16. Marengo SR. Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Anim Reprod Sci.* 2008;105:52-63.
17. Shivaji S. Seminal plasmin: a protein with many biological properties. *Biosci Reprod.* 1988;8:609-18.
18. Young WC. A study of the function of the epididymis. III Functional changes undergone by spermatozoa during their passage through the epididymis and vas deferens of the guinea pig. *J Exp Biol.* 1931;8:151-64.
19. Orgebin-Crist MC. Studies on the function of the epididymis. *Biol Reprod (Suppl. 1).* 1969;155-75.
20. Nishimune Y, Okabe M. Mammalian male gametogenesis, growth, differentiation and maturation of germ cells. *Dev Growth Differ.* 1993;34:479-86.
21. Jones R. Plasma membrane structure and remodeling during sperm maturation in the epididymis. *J Reprod Fertil Suppl.* 1998;53:73-84.
22. Holtz W, Smidt D. The fertilizing capacity of epididymal spermatozoa in the pig. *J Reprod Fertil.* 1976;46:227-9.
23. Amann RP, Griel C. Fertility of bovine spermatozoa from rete testis, cauda epididymis, and ejaculated semen. *J Dairy Sci.* 1974;57:212-9.
24. Maxwell WMC, Johnson LA. Physiology of spermatozoa of a dilution rates: the influence of seminal plasma. *Theriogenology.* 2000;52:1273-80.
25. Tiplady CA, Morris LHA, Allen WR. Stallion epididymal spermatozoa: pre-freeze and post-thaw motility and viability after three treatments. *Theriogenology.* 2002;58:225-8.
26. Morris L. Low dose insemination in the mare: an update. *Anim Reprod Sci.* 2004;82:625-32.
27. Moore I, Squires, EL, Graham JK. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology.* 2005;63:2372-81.

28. Pasquini DF, Melo CM, Papa FO, Fioratti EG, Landim-Alvarenga FC, Alvarenga MA, et al. Effects of seminal plasma and sperm motility factors on viability of epididymal sperm of stallions, *Anim Reprod Sci.* 2008;107:338-339.
29. Card C. E, Manning ST, Bowman P, Leibel T. Pregnancies from imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in a disabled stallion. *Can Vet J.* 1997;38:171-4.
30. McDonnell SM. Oral imipramine and intravenous xylazine for pharmacologically-induced ex copula ejaculation in stallions. *Anim Reprod Sci.* 2001;68:153-9.
31. James AN, Green H, Hoffman S, Landry, AM, Paccamonti D, Godke RA. Preservation of equine sperm stored in the epididymis at 4 °C for 24, 48, 72 and 96 hours. *Theriogenology.* 2002;58:401-4.
32. James, A.N. Preservation of sperm harvested from the rat, caprine, equine and bovine epididymis. [Tese]. Baton Rouge: Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2004.
33. Johnston PF, DeLuca JL. Chemical ejaculation of stallions after administration of oral imipramine followed by intravenous xylazine. *Proc. AAEP.* 1998;43:59–62.
34. McDonnell SM, LOVE CC. Xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology.* 1991;36:73–6.
35. McDonnell SM, ODIAN MJ. Imipramine and xylazine-induced ex copula ejaculation in stallions. *Theriogenology.* 1994;41:1005–10.
36. Guerrero CA. Cryopreservation and intracytoplasmic sperm injection with bovine epididymal spermatozoa. [Tese]. Baton Rouge: Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College; 2006.
37. Yu I, Leibo SP. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology.* 2002;57:1179-90.
38. Hishinuma M, Suzuki K, Sekine J. Recovery and cryopreservation of sika deer (*cervus nippon*) spermatozoa from epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology.* 2003;59:813-20.
39. Bartels P, Lubbe K, Kilian I, Friedmann Y, Van Dyk G, Mortimer D. In vitro maturation and fertilization of lion (*Panthera leo*) oocytes using frozenthawed epididymal spermatozoa recovered by cauda epididymectomy of an immobilized lion. *Theriogenology.* 2000;53:325. (Abstr.).
40. Garde J, Aguado M, Perez S, Garrido D, Perez-Guzman M, Montoro V. Physiological characteristics of epididymal spermatozoa from postmortem rams. *Theriogenology.* 1994;41:2003.
41. Bruemmer JE. Collection and Freezing of Epididymal Stallion Sperm. *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2006;22:677-82.

42. Martinez-Pastor F, Macias VG, Alvarez M, Chamorro C, Herraes P, Paz P, et al. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer. *Theriogenology*. 2006;65:471-85.
43. Temple-Smith PD, Southwick GJ, Yates CA, Trounson AO, Kretser DM. Human pregnancy by in vitro fertilization (IVF) using sperm aspirated from the epididymis. *J In Vitro Fertil Embryo Transf*. 1985;2:119-22.
44. Silber SJ, Devroey P, Van Steirteghem AC. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Hum Reprod*. 1994;19:5-9.
45. Shrivastav P, Nadkarni P, Wensvoort S. Percutaneous epididymal sperm aspiration for obstructive azoospermia. *Hum Reprod*. 1994;9:2058-61.
46. Foote RH. Letter to the editor. *J Androl*. 2000;21:355.
47. Melo CM, Papa FO, Fioratti EG, Villaverde AISB, Avanzi BR, Monteiro GA, et al. Comparison of three different extenders for freezing epididymal stallion sperm. *Anim Reprod Sci*. 2008;107:331.
48. Heise A, Ahn WK, Volkmann DH, Thompson PN, Gerber D. Influence of seminal plasma on fertility of fresh and frozen-thawed stallion epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T43-4WJHB5G-1&_user=972052&_coverDate=06%2F18%2F2009&_alid=945673879&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=search&_cdi=4963&_sort=r&_docanchor=&view=c&_ct=32&_acct=C000049647&_version=1&_urlVersion=0&_userid=972052&md5=f6e8a50e843035aa0edce2f74a9cc1d8>. Acesso: 01 jul.2009.

Recebido em: 06/05/2009

Aceito em: 10/08/2009