

RECUPERAÇÃO DE ESPERMATOZÓIDES EPIDIDIMÁRIOS DE GATOS DOMÉSTICOS (*Felis catus*) UTILIZANDO SOLUÇÕES À BASE DE TRIS OU ÁGUA DE COCO EM PÓ

[Recovery of epididymal sperm from domestic cats (*Felis Catus*) using Tris- or powdered coconut water-based solutions]

K.D.M. Emerenciano¹, G.L. Lima¹, G.C.X. Peixoto¹, M.A. Silva¹, M.G.C.Oliveira², V.V. de Paula², A.R. Silva^{1*}

¹ Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal,

² Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, Mossoró, RN, Brasil.

RESUMO - Objetivou-se comparar a eficiência de soluções a base de Tris e água de coco (ACP- 117®) utilizadas para a recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*) pelo método da flutuação. Treze gatos foram orquiectomizados e seus complexos testículos-epidídimos foram transportados ao laboratório, onde foram dissecados e lavados com solução fisiológica (37°C). A cauda do epidídimo foi fatiada, sendo os espermatozoides obtidos pelo método de flutuação, comparando-se duas soluções: Tris e ACP®. Após a recuperação dos espermatozoides foi realizada a avaliação da motilidade, vigor, concentração, morfologia e viabilidade espermática, e integridade de membrana. A técnica de flutuação permitiu a obtenção de espermatozoides em todos os gatos. As soluções foram equivalentes quanto a qualidade dos espermatozoides recuperados, com exceção da motilidade espermática, a qual foi significativamente superior no uso da solução a base de Tris ($P < 0,05$) que apresentou valores de $73,1 \pm 4,8\%$, enquanto apenas $44,7 \pm 8,9\%$ de espermatozoides móveis foram obtidos com o ACP®. Conclui-se que a recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos pelo método de flutuação permite obter espermatozoides de boa qualidade, sendo recomendado o uso do diluente Tris.

Palavras-Chave: Gatos, sêmen, epidídimo, ACP, TRIS.

ABSTRACT - The aim was to compare the efficiency of the Tris- and coconut water-based (ACP- 117®) solutions on the recovering of epididymal sperm from domestic cats (*Felis catus*) through the fluctuation method. Thirteen cats were submitted to orchietomies and the testicle-epididymis complexes were transported to the laboratory, dissected and washed with saline (37 °C). The epididymis tail was sliced and the sperm were recovered by the fluctuation method by comparing two solutions: Tris and ACP®. After recovering, sperm were evaluated for motility, vigor, concentration, morphology, viability and membrane integrity. The fluctuation technique presented 100% efficiency, allowing the sperm recovery from all the toms. Both solutions were equivalent concerning to the quality of the recovered sperm, except for the sperm motility, that was significantly higher in the use of the Tris-based solution ($P < 0.05$) with values of $73.1 \pm 4.8\%$, while $44.7 \pm 8.9\%$ motile sperm were obtained in the use of ACP®. In conclusion, the recovery of epididymal sperm from domestic cats through the fluctuation method allows the obtaining of good quality sperm, and the use of Tris is suggested as the extender.

Keywords: Cats; semen; epididymis; ACP, TRIS.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem-se observado um crescimento significativo na criação de gatos domésticos (*Felis catus*), o que tem levado ao desenvolvimento de um mercado de produtos e serviços cada vez mais especializados (Silva, 2008). Os gatos têm sido

mantidos não somente como animais de companhia, mas sua criação desponta como uma atividade comercial, o que aumenta a necessidade dos criadores em potencializar a capacidade reprodutiva de seus animais (Silva Jr, 2002). Além disso, das 37 espécies de felídeos existentes, apenas o gato doméstico não se encontra ameaçado de extinção, o

* Email para correspondência: legio2000@yahoo.com

que faz destes animais excelentes modelos experimentais para os demais (Carrijo Jr et al., 2010).

Nesse contexto, a coleta de gametas de boa qualidade representa um papel fundamental nos procedimentos de reprodução assistida, tais como inseminação artificial (Tsutsui et al., 2003) e fertilização *in vitro* (FIV) (Pope, 2004). A eletroejaculação (Zambelli et al., 2006) e o uso de vagina artificial (Tanaka et al., 2000) são as técnicas mais utilizadas com este propósito em gatos domésticos, entretanto a necessidade de equipamentos e condicionamento dos animais muitas vezes impede a sua aplicação. Por outro lado, a recuperação de espermatozoides epididimários representa um recurso útil em casos de animais que precisam ser esterilizados ou que vêm subitamente a óbito, já que os espermatozoides obtidos por esta técnica são morfológicamente viáveis e permanecem aptos à fertilização (Tsutsui et al., 2003).

Sabe-se que as soluções utilizadas no processamento de células espermáticas podem influenciar em sua qualidade. Os espermatozoides tem sido comumente recuperados do epidídimo de gatos domésticos através do uso de diferentes soluções, como o Ringer sem lactato (Villaverde et al., 2007), a solução fisiológica 0,9% (Tebet et al., 2006), e o Tris acrescido ou não de gema de ovo (Chatdarong et al., 2010). Em cutias (*Dasyprocta aguti*), foi recentemente demonstrado que uma solução à base de água de coco em pó poderia ser utilizada para a recuperação de espermatozoides epididimários (Silva et al., 2011). A água de coco é uma solução natural e estéril, composta de diversas substâncias necessárias para a conservação de células, dentre elas as espermáticas (Blume e Marques Jr, 1994), o que poderia ser também benéfico na recuperação dos espermatozoides epididimários felinos.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou comparar a eficiência de soluções a base de Tris e água de coco (ACP- 117®) utilizadas para a recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*) pelo método da flutuação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local do experimento

O experimento foi conduzido no Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal (LCGA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró – RN. Os epidídimos utilizados no experimento foram provenientes de cirurgias eletivas de orquiectomia realizadas no Hospital Veterinário Jerônimo Dix-Huit Rosado Maia (HOVET), da UFERSA. Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da UFERSA, segundo o parecer nº 06/2011.

Grupo experimental

Foram utilizados treze gatos (*Felis catus*) machos, jovens, com idade média de 2 anos, sem padrão racial definido (SPRD), oriundos de proprietários particulares da cidade de Mossoró, RN. Os animais foram previamente submetidos ao exame clínico e laboratorial (Hemograma completo, ALT, Fosfatase alcalina) a fim de garantir sua higidez. Foram utilizados apenas animais que possuíam os dois testículos normais à palpação, apresentando-se simétricos, com consistência firme, e sem quaisquer alterações detectáveis macroscopicamente.

Obtenção do epidídimo e dos espermatozoides

Os gatos foram previamente submetidos a um jejum hídrico e alimentar de 12 horas e foram orquiectomizados. Os complexos testículos–epidídimos foram envolvidos em gaze umedecida com solução fisiológica 0,9% e colocados em Becker previamente esterilizado, e transportados imediatamente ao LCGA, em um tempo máximo de 3 minutos. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi (nº15), os epidídimos foram dissecados e separados do testículo, sendo feita uma lavagem externa com solução fisiológica pré-aquecida (37°C), para remoção do sangue.

Cada epidídimo de um mesmo animal foi destinado à recuperação de espermatozoides utilizando-se uma das soluções a serem testadas: o Tris ou a solução a base de água de coco em pó (ACP-117®). O diluente Tris era composto por 3,028 g de Tris-hidroximetilaminometano, 1,78 g de ácido cítrico monohidratado, e 1,25 g D-frutose dissolvidos em 100 mL de água ultrapura, com osmolaridade final de 295 mOsm/L e pH 6,6. Já o ACP-117® foi preparado conforme recomendações do fabricante (ACP-Biotecnologia, Fortaleza, Brasil), sendo que um envelope contendo 12 g do produto foi dissolvido em 50 mL de água ultrapura, obtendo-se uma solução com osmolaridade de 307 mOsm/L e pH 7,4.

Finalmente, cada cauda do epidídimo foi dividida em pequenos fragmentos, com auxílio de uma tesoura, e estes permaneceram incubados em 1 ml das soluções, pré-aquecidas a 37°C, por 1 minuto.

Avaliação dos espermatozoides

Imediatamente após a obtenção, os espermatozoides foram avaliados quanto às suas características, segundo as normas do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998). Para avaliação do pH, utilizaram-se fitas apropriadas. Em seguida, uma alíquota (5 µL) do lavado epididimário foi utilizada para avaliação da motilidade total, realizada sob microscopia de luz, em aumento de 100 X, e registrada em dados percentuais. A determinação da intensidade do movimento dos espermatozoides (vigor) foi também realizada por microscopia de luz, em aumento de 400 X, atribuindo-se escala de 0 (ausência de movimentos) a 5 (movimentos rápidos progressivos).

Alíquotas de 5 µL do lavado epididimário foram adicionadas de 5 µL do corante supravital azul de bromofenol para a preparação de esfregaços destinados a avaliação da viabilidade e morfologia espermática, contando-se cem células por lâmina, sob microscopia de luz (400x e 1.000x). As anormalidades morfológicas dos espermatozoides foram classificadas em primárias e secundárias (Johnston et al., 2001).

Para análise da concentração espermática (espermatozoides x 10⁶/ml), uma alíquota de 5 µl foi diluída em solução salina formolizada (500 µl) e determinada utilizando-se a câmara de Neubauer. A partir deste parâmetro, foi calculado o número total de espermatozoides recuperados.

A função da membrana espermática foi avaliada por meio do teste hiposmótico realizado imediatamente após a coleta das amostras utilizando-se 45 µL de água destilada (0mOsm/l) como solução hiposmótica.

Análise Estatística

Os resultados referentes às características dos espermatozoides epididimários dos gatos foram expressos na forma de média e desvio padrão, e analisados através do programa Sigmastat 3.5 (Systat Software Inc., San Jose, CA, USA). Os dados de integridade de membrana plasmática, e de motilidade, viabilidade, e morfologia espermática

sofreram transformação angular em ArcoSeno e, juntamente com os dados referentes ao número de espermatozoides, foram avaliados pela Análise de Variância seguida do teste t de Student. Os dados referentes ao vigor espermático foram avaliados pelo teste de Mann Whitney. Todos os resultados foram considerados significativos quando $P < 0,05$.

RESULTADOS

A técnica de flutuação permitiu a obtenção de espermatozoides a partir dos epidídimos de todos os 13 gatos. O lavado epididimário, com ambas as soluções, apresentou pH variando de 6 a 7.

Os resultados referentes à avaliação dos espermatozoides epididimários recuperados utilizando-se as diferentes soluções encontram-se expressos na Tabela 1. As duas soluções foram equivalentes neste propósito, exceto no que diz respeito a motilidade espermática, a qual foi significativamente superior no uso da solução a base de Tris ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

O interesse no uso de espermatozoides epididimários de animais domésticos e silvestres vem aumentando, uma vez que se constitui em uma alternativa viável para a obtenção de gametas de animais com dificuldade para ejacular ou que morreram de forma inesperada bem como representa uma importante fonte de material genético na formação de bancos de germoplasma (Silva et al. 2004). No presente estudo, a recuperação foi realizada pelo método de flutuação, a qual permitiu a obtenção de espermatozoides de boa qualidade, com características que permitem seu uso posterior. Em animais de pequeno porte, a recuperação pelo método de flutuação tem sido o método de eleição devido ao tamanho do epidídimo (Yu e Leibo, 2002). Entretanto, alguns autores sugerem que a colheita de espermatozoides da cauda do epidídimo através do fluxo retrógrado seria a técnica mais indicada, pois as amostras obtidas são menos contaminadas e de melhor qualidade em relação aos outros métodos. Porém, a lavagem retrógrada possui a limitação de ser mais aplicável para animais de maior porte devido ao tamanho do epidídimo (Martinez-Pastor et al., 2006).

Tabela 1. Características dos espermatozoides epididimários recuperados de gatos domésticos, utilizando-se as soluções a base de Tris e água de coco em pó (ACP-117®).

Características espermáticas	Soluções utilizadas			
	Tris		ACP-117®	
	Média ± DP	Varição	Média ± DP	Varição
Número de espermatozoides (x10 ⁶)	109,2 ± 32,5	(20-330)	175 ± 46,9	(30-500)
Motilidade (%)	73,1 ± 4,8 ^a	(40-90)	44,7 ± 8,9 ^b	(1-90)
Vigor (0-5)	3,5 ± 0,2	(2 -5)	3 ± 0,4	(1-5)
Viabilidade (%)	41,7 ± 7,2	(4-76)	58,2 ± 6,2	(2-88)
Integridade de membrana (%)	65,64 ± 4,815	(37-90)	66,64 ± 7,7	(8-96)
Morfologia Normal (%)	83,67 ± 2,61	(71-97)	73,20 ± 4,645	(47-92)
Alt Primárias (%)	0,667 ± 0,289	(0-2)	0,20 ± 0,133	(0-1)
Alt Secundárias (%)	15,89 ± 2,563	(3-29)	26,60 ± 4,62	(8-53)

a,b indicam diferença estatística entre tratamentos, na mesma linha (P < 0,05).

Em algumas amostras obtidas neste estudo foi verificado um grande número de hemácias, as quais foram apenas avaliadas subjetivamente, sendo evidenciada a presença destas na câmara de Neubauer, bem como a grande quantidade de restos celulares no meio de recuperação, dificultando a manipulação dos espermatozoides recuperados. De fato, Chatdarong et al. (2010) relatam que os espermatozoides recuperados através do método de flutuação são inevitavelmente contaminados com células epiteliais, eritrócitos, leucócitos, bactérias e debris, os quais podem levar a produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) podendo afetar a capacidade fecundante dos espermatozoides. Martinez-Pastor et al. (2006) afirmam ainda que o sangue e o fluido intersticial podem alterar a composição, a osmolaridade e o pH do meio utilizado na recuperação, expondo os espermatozoides a condições deletérias. Em estudo utilizando sêmen congelado – descongelado de cães, a presença de sangue total no mesmo promoveu diminuição da qualidade seminal, sendo atribuída a hemólise e hemoglobina livre (Rijsselaere et al., 2004). Estudos futuros são necessários para verificar a influência destes contaminantes sobre as características pós congelamento-descongelamento dos espermatozoides epididimários de gatos, bem como sobre sua capacidade fecundante.

No presente trabalho, o número de espermatozoides recuperados por flutuação foi semelhante ao descrito por Cocchia et al., 2009, que obtiveram cerca de 109,17 milhões de espermatozoides, e superior ao descrito por Tebet e Martins (2006), cuja média foi de 52.30 milhões, ambos em felinos domésticos. Martinez-Pastor et al. (2006) descrevem que o número de espermatozoides recuperados tem uma

consequência direta no número de doses inseminantes a serem produzidas a partir de cada amostra. Este parâmetro tem significância na formação de bancos de germoplasma, principalmente porque, através deste método, só há uma única oportunidade de se obter gametas de cada macho e isto é relevante em se tratando de espécies ameaçadas.

Ambas as soluções utilizadas foram eficientes na manutenção de espermatozoides epididimários. Entretanto, verificou-se uma superioridade do tampão Tris com relação a motilidade espermática, quando comparado ao ACP®. Sabe-se que o Tris é uma solução-tampão que tem sido largamente utilizada como diluente para a tecnologia do sêmen de várias espécies como cães (Silva et al., 2003), bovinos (Thun et al., 2002), caprinos (Eiman et al., 2004) e felinos (Zambelli et al., 2002). O Tris não apenas apresenta atividade tampão, mas também atua na redução do metabolismo da frutose pela célula espermática, contribuindo assim para a preservação de sua energia (Rodrigues, 1997). Os resultados de motilidade e vigor obtidos com o Tris são similares aos descritos por Muller (2010), que obteve 76% de espermatozoides móveis recuperados do epidídimo de gatos domésticos, utilizando-se também a flutuação.

Com relação ao ACP®, este tem sido utilizado com sucesso na conservação de espermatozoides ejaculados de diferentes espécies incluindo o gato doméstico (Silva, 2008). As características bioquímicas do ACP® são similares àquelas da água de coco *in natura*, mas esta apresentação em pó oferece a vantagem de ser facilmente acondicionada e enviada para regiões onde os frutos não estão

disponíveis (Lima et al., 2010). Sua composição inclui nutrientes necessários para a sobrevivência celular, como sais, proteínas, açúcares, vitaminas, gorduras neutras, indutores de divisão celular e vários eletrólitos (Blume e Marques Jr, 1994). Quando tal solução foi pela primeira vez utilizada na recuperação de espermatozoides epididimários de uma espécie, no caso da cutia, verificou-se que a mesma apresentou uma eficiência similar ao Tris, sendo inclusive superior a este quando da posterior criopreservação dos espermatozoides obtidos (Silva et al., 2011). Em se tratando da relação entre a ACP® e a motilidade espermática, em um estudo realizado com criopreservação de sêmen de cães foi observado que a ACP® não permitiu uma completa dissolução da gema de ovo na solução, resultando na formação de grandes quantidades de debris, os quais poderiam ter diminuído a motilidade espermática (Cardoso et al., 2007). No presente trabalho, a redução da motilidade dos espermatozoides obtidos com o ACP®, quando comparado ao Tris, é sugestiva de alguma interação específica entre os fluidos epididimários e/ou a membrana espermática e a solução de lavagem, o que pode ter afetado a motilidade dos espermatozoides. Entretanto, estudos sobre a interação da solução a base de ACP® e espermatozoides epididimários de gatos domésticos são requeridos para confirmar a hipótese apresentada. Caso este fato venha a ser confirmado, isto poderia se configurar uma característica da espécie felina.

O percentual de espermatozoides viáveis encontrado no presente trabalho, utilizando ambas as soluções, foi inferior ao descrito por outros autores (Toyonaga et al., 2010). Isto pode ser decorrente da coloração empregada, o azul de bromofenol, a qual pode não ser adequada para utilização nesta espécie, haja vista ser este um dos primeiros trabalhos que mostram sua utilização para tal. Estudos tem descrito a utilização da eosina-nigrosina e do corante verde FCF-Rosa de Bengala para esta finalidade (Villaverde; Lopes, 2007).

No que diz respeito a avaliação da morfologia espermática, foram encontrados valores superiores a 70% de células morfologicamente normais, resultados também encontrados em outros estudos nessa espécie (Muller, 2010). Apesar da teratozoospermia ser amplamente relatada em felinos em diversas pesquisas (Jewgenow et al., 2009), esta pode ser uma condição “ocasional”, na qual gatos domésticos produzem periodicamente maiores percentuais de espermatozoides anormalmente formados, devido à regulação sazonal (Blottner e Jewgenow, 2007) ou mesmo à abstinência sexual, a fatores nutricionais e de saúde. Em felinos alguns

autores caracterizam como normospermia uma porcentagem maior que 60% de espermatozoides normais presentes no ejaculado e teratozoospermia como sendo uma porcentagem menor que 40%. De modo geral, os gatos tipicamente possuem uma grande variação na qualidade espermática e, em contraste aos animais de produção, não só os gatos com melhor qualidade seminal serão de interesse para preservação espermática (Axné e Linde, 2007).

CONCLUSÃO

Diante do exposto, o presente trabalho sugere que a recuperação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos pelo método de flutuação permite obter espermatozoides de boa qualidade, utilizando os diluentes Tris e ACP®, sendo o primeiro mais recomendado para este fim, haja vista permitir a obtenção de uma maior porcentagem de espermatozoides móveis.

REFERÊNCIAS

- Axnér E., Linde Forsberg., C. 2007. Sperm morphology in the domestic cat and its relation with fertility. A retrospective study. *Reprod Domest Anim*, 42: 282-291.
- Blottner S., Jewgenow K. 2007. Moderate seasonality in testis function of domestic cat. *Reprod Domest Anim*. 42: 536-540.
- Blume H., Marques Jr. 1994. Avaliação da água de coco no cultivo e criopreservação de embriões murídeos. *Rev Bras Reprod Anim*, 18: 97-104.
- Cardoso RCS., Silva AR., Silva LDM., Chirinéa VH., Souza FF., Lopes MD. 2007. Evaluation of Fertilizing Potential of Frozen-thawed dog Spermatozoa Diluted in ACP-106_ using an In Vitro Sperm-Oocyte Interaction Assay. *Reprod Dom Anim*. 42:11-16.
- Carrijo Jr AO., Marinho APS., Campos AA., Amorim CA., Bão SN., Lucci CM. 2010. Morphometry, Estimation and Ultrastructure of Ovarian Preantral Follicle Population in Queens. *Cells Tissues Organs*, 191:152-160. DOI: 10.1159/000225935.
- CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 1998. Belo Horizonte: CBRA. 53p.
- Chatdarong K., Thuwanut P., Morrell JM. 2010. Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology*. 73: 1284-1292.
- Cocchia N., Ciani F., El-Rass R., Russo M., Borzacchiello G., Esposito V., Montagnaro S. 2009. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote*. 18: 1-8.

- Eiman M., Aboagla E., Terada T. 2004. Effects of egg yolk during step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62: 1160-1172.
- Jewgenow K., Neubauer K., Blottner S., Schön J., Wildt DE., Pukazhenthil BS. 2009. Reduced germ cell apoptosis during spermatogenesis in the teratospermic domestic cat. *J Androl*. 30: 460-468.
- Johnston SD., Kustritz MVR., Olson PNS. 2001. *Canine and Feline Theriogenology*. Philadelphia, W. B. Saunders. 592p.
- Lima GL., Costa LLM., Cavalcanti DMLP., Rodrigues CMF., Freire FAM., Fontenele-Neto JD., Silva AR. 2010. Short-term storage of canine preantral ovarian follicles using a powdered coconut water (ACP1)-based médium. *Theriogenology*. 74: 146-152.
- Martinez-Pastor F., Macias VG., Alvarez M., Chamorro C., Herraes P., Paz P., Anel L. 2006. Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymidis of Iberian red deer. *Theriogenology*. 65: 471-485.
- Muller G. *Esteroidogênese Testicular de Gatos domésticos (Felis Catus) e sua relação com a morfologia espermática e composição lipídica de espermatozoides da cauda do epidídimo*. 2010. 117f. Dissertação (Doutorado em Biologia Celular e Molecular)- Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- Pope CE. 2004. In vitro fertilization and embryo transfer in felids. *Methods Mol Biol*. 254: 227-244.
- Rijsselaere T., Van Soom A., Maes D., Verberckmoes S., de Kruif A. 2004. Effect of blood admixture on in vitro survival of chilled and frozen-thawed canine spermatozoa. *Theriogenology*. 61: 1589-1602.
- Rodrigues BA. *Efeito do diluidor à base de albumina sérica bovina (BSA) sobre a viabilidade in vitro do sêmen canino criopreservado*. 1997. 176f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1997.
- Silva AR., Cardoso RC., Uchoa DC., Silva LD. 2003. Quality of canine semen submitted to single or fractioned glycerol addition during the freezing process. *Theriogenology*. 59: 821-829.
- Silva AR., Morato RG., Silva LD. 2004. The potential for gamete recovery from non-domestic canids and felids. *Anim Reprod Sci*. 81: 159-175.
- Silva TFP. *Avaliação andrológica, métodos de coleta e tecnologicado sêmen de gatos domésticos utilizando água de coco em pó (ACP-117®)*. 2008. 183 f. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias)-Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária, Fortaleza, 2008.
- Silva MA., Peixoto GCX., Sousa PC., Bezerra FS., Bezerra AC., Silva AR. 2011. Interactions between Straw Size and Thawing Rates on the Cryopreservation of Agouti (*Dasyprocta aguti*) Epididymal Sperm. *Reprod Domest Anim*, doi: 10.1111/j.1439-0531..01817.x, 2011.
- Tanaka A., Takagi Y., Nakagawa K., Fujimoto Y., Hori T., Tsutsui T. 2000. Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. *J Vet Med Sci*. 2: 241-245.
- Tebet JM., Martins MIM. 2006. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*. 66: 1629-1632.
- Thun R., Hurtado M., Jannet F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus® and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 57: 1087-1094.
- Toyonaga M., Sato Y., Morita M., Watanabe M., Oba H., Mizutani T., Hori T., Tsutsui T. 2010. The Qualities of Cryopreserved Epididymal Sperm Collected from Feline Epididymides Stored at Low Temperature. *J. Vet Med Sci*. 6: 777-780.
- Tsutsui T., Wada M., Anzai M., Hori T. 2003. Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci*. 65: 397-399.
- Villaverde AISB., Lopes MD. 2007. Inseminação Artificial em gatos domésticos utilizando sêmen criopreservado. *Rev Bras Reprod Anim*. 31: 77-83.
- Zambelli D., Caneppele B., Castagnetti C., Belluzzi S. 2002. Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reprod Domest Anim*. 37: 310-313.
- Zambelli D., Merlo B., Iacono E., Prati F., Belluzzi S. 2006. Fertilizing ability of electro-ejaculated cryopreserved semen in the domestic cat. *Reprod Domest Anim*. 41: 137-141.
- Yu I., Leibo S.P. 2002. Recovery of motile, membrane-intact spermatozoa from canine epididymides stored for 8 days at 4°C. *Theriogenology*. 57: 1179-1190.