



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA-UFRA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E PRODUÇÃO ANIMAL NA AMAZÔNIA**

**SILMARA LETICIA GONÇALVES LIMA**

**CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS  
DE GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*): Estabelecimento de protocolos para felinos  
selvagens ameaçados de extinção**

**BELÉM - PA**

**2020**

**SILMARA LETICIA GONÇALVES LIMA**

**CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS  
DE GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*): Estabelecimento de protocolos para felinos  
selvagens ameaçados de extinção**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Sheyla Farhayldes Souza Domingues.

BELÉM - PA

2020

**SILMARA LETICIA GONÇALVES LIMA**

**CONGELAÇÃO E VITRIFICAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES  
EPIDIDIMÁRIOS DE GATO DOMÉSTICO (*Felis catus*): Estabelecimento de  
protocolos para felinos selvagens ameaçados de extinção**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Saúde e Produção Animal na Amazônia, para obtenção do título de Mestre.

Aprovado em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2020.

Banca Examinadora:

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sheyla Farhayldes Souza Domingues

Instituto de Medicina Veterinária-UFPA

Orientadora

---

Sarah Raphaella Rocha de Azevedo Scalercio

CENP - Centro Nacional de Primatas

Membro Titular

---

Karol Guimarães Oliveira

CENP - Centro Nacional de Primatas

Membro Titular

---

Danuza Leite Leão

Pesquisadora do Instituto de Desenvolvimento

Sustentável Mamirauá

Membro Titular

## LISTA DE TABELAS

		Pág
Tabela 1	Estudos com congelação de espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos ( <i>Felis catus</i> ).	19
Tabela 1	Média e Desvio padrão, dos parâmetros de Motilidade, Vigor e Integridade de Membrana Plasmática (ITM) dos espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos domésticos nos tempos de incubação T0, T1 e T2, de acordo com as osmolaridades (275, 325, 375, 425, 475 e 525 mOsm) no diluidor Tris-citrato.	782
Tabela 2	Média e Desvio Padrão dos parâmetros de Motilidade, Vigor e Integridade de Membrana Plasmática (ITM) dos espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos domésticos no controle (fluido epididimal), nas osmolaridades de 325 e 375 mOsm e durante as etapas de diluição, resfriamento e congelação, com o emprego dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol.	783
Tabela 3	Média e Desvio Padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos domésticos no controle (fluido epididimal), nas osmolaridades de 325 e 375 mOsmol e durante as etapas de diluição, resfriamento e congelação, com o emprego dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol.	783
Tabela 1	Equilibrium (ES) and Vitrification (VS) solutions composition, time and temperature of exposure used to vitrify epididymal tail of cats in solid surface (SSV).	27
Tabela 2	Mean ( $\pm$ SD) percentages of normal sperm and sperm morphology (with major and minor pathologic defects) of epididymal sperm post vitrification with ethylene glycol (EG) and glycerol (GL). Data from five ( $n = 5$ ) distinct tomcats. There were no differences among treatments ( $P < 0.05$ ).	28
Tabela 3	Mean and standard deviation of Intact plasma membrane (Hoechst/Propidium iodine) and motility parameters assessed by CASA after devitrification with ethylene glycol and glycerol. Data from five ( $n = 5$ ) distinct tomcats.	29

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Mean and standard deviation of motility, plasma and acrosomal membrane integrity of cat epididymal sperm before (control) and after vitrification with ethylene glycol and glycerol. Data from five ( $n = 5$ ) distinct tomcats. % LIA - Live sperm with intact acrosome, % DIA - Dead sperm with intact acrosome, % TAR Live sperm with detached acrosome, % FAR - Dead sperm with detached acrosome. TAR, FAR = true and false acrosome reactions. A,B,C - Values followed show differences between treatments ( $P < 0.05$ ). 31
- Figura 2 Assessment of plasma membrane and acrosomal integrity by fluorescent probes (H33342 / PI) and Trypan Blue/Giemsa staining from post-vitrified epididymal cat spermatozoa. A - sperm cells emitting fluorescence by H33342. B - Same field emitting fluorescence by PI. C - 1) spermatozoa with intact plasma membrane and acrosome and 2) spermatozoa with damaged plasma membrane and intact acrosome at 100x magnification. 31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem, unidade de razão na base 100
<	Símbolo matemático que indica valores inferiores
>	Símbolo matemático que indica valores superiores
±	Símbolo utilizado entre as unidades estatísticas de média e desvio padrão
®	Marca registrada
µg	Micrograma, unidade de medida de massa
µL	Microlitro, unidade de medida de volume
ANOVA	Análise de variância
ALH	Deslocamento lateral da cabeça
BFC	Frequência de batimento
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DIA	Espermatozóide morto com acrossoma intacto
ES	Solução de Equilíbrio
EG	Etilenoglicol
FAR	Esperma morto com acrossoma separado
GL	Glicerol
LIA	Esperma vivo com acrossoma intacto
LIN	Linearidade
mg	Miligrama, unidade de medida de massa
mL	Mililitro, unidade de medida de volume
mm	Milímetro, unidade de medida de comprimento
mOsm	Miliosmol
ITM	Integridade de Membrana plasmática

MT	Motilidade total
MOT	Porcentagem de células móveis
°C	Graus Celsius
P	Símbolo estatístico que denota grau de significância entre as variáveis estudadas
PMI	Membrana plasmática intacta
PMOT	Porcentagem de células progressivas móveis
SUC	Sucrose
SSV	Vitrificação em Superfície Sólida
VS	Solução de Vitrificação
VCL	Velocidade do caminho
VAP	Velocidade média do caminho
VSL	Deslocamento progressivo
STR	Retidão
TAR	Esperma vivo com acrossoma separado
WOOB	Coefficiente de oscilação

## RESUMO

Objetivou-se investigar o efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato acrescido de glicerol ou etilenoglicol na congelação de espermatozóides epididimários e realizar a vitrificação da cauda do epidídimo, para recuperação de espermatozoides viáveis de gatos domésticos (*Felis catus*). Dessa forma, o trabalho foi dividido em duas fases. **Fase 1:** Avaliou-se a manutenção dos parâmetros espermáticos em diluidor tris-citrato com osmolaridades 275, 325, 375, 425, 475 e 525mOsm, nos tempos (T0= 0, T1= 30 e T2= 60 min). E a congelação utilizando as osmolaridades 325 e 375 mOsm com glicerol a 4% ou etilenoglicol a 3%, 6% em espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos domésticos. **Fase 2:** Desenvolver um protocolo de vitrificação da cauda do epidídimo de gatos domésticos para a recuperação de espermatozoides viáveis, utilizando glicerol e etilenoglicol a 40% associados a sacarose a 0,1M, utilizando a de vitrificação de equilíbrio com a técnica de vitrificação em superfície sólida (SSV). Na **Fase 1**, dentre as osmolaridades, a motilidade da 325 mOsm não diferiu estatisticamente com o fluido epididimal (controle a fresco) nos três tempos e a 375 mOsm no T0 e T1, e ambas não apresentaram diferenças estatísticas entre si e entre os tempos em todos os parâmetros espermáticos. O uso de 4% de glicerol em diluidor com 375 mOsm foi superior, apresentando motilidade de  $25\% \pm 6$ , vigor 4, integridade de membrana plasmática de  $48\% \pm 9$  após a congelação, não apresentou diferenças estatísticas com a etapa de resfriamento e na morfologia não foram encontradas diferenças estatísticas entre as duas osmolaridades em todas as etapas da congelação. Na **Fase 2**, o tratamento com etilenoglicol teve melhores resultados para todos os parâmetros de motilidade espermática (Motilidade, Vigor, CASA) comparados para glicerol ( $P < 0,05$ ). Não houve diferenças estatísticas nos parâmetros de integridade de membrana plasmática e do acrossoma (Azul de tripan e Giemsa), integridade de membrana plasmática utilizando também (corantes fluorescentes Hoechst e Iodeto de propídio) e na morfologia normal dos espermatozoides antes e depois da vitrificação entre os grupos experimentais. Os resultados do presente estudo mostraram que o Tris-citrato com 325 e 375 mOsm entre as osmolaridades testadas e pós congelação com 375 mOsm e glicerol 4% manteve os parâmetros espermáticos, e foi obtido sucesso na vitrificação da cauda do epidídimo com etilenoglicol a 40% associado com sacarose (0,1 M), em espermatozoides epididimários de gatos domésticos.

**Palavras-chave:** Criopreservação, Espermatozoides do Epidídimo, Felino.



## ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the effect of different osmolarities of the Tris-citrate thinner plus glycerol or ethylene glycol on the freezing of epididymal sperm and to vitrify the tail of the epididymis, to recover viable sperm from domestic cats (*Felis catus*). Thus, the work was divided into two phases. **Phase 1:** The maintenance of sperm parameters in a tris-citrate thinner with osmolarities 275, 325, 375, 425, 475 and 525mOsm was evaluated, at times (T0 = 0, T1 = 30 and T2 = 60 min). And freezing using osmolarities 325 and 375 mOsm with 4% glycerol or 3% ethylene glycol, 6% in sperm from the tail of the domestic cat's epididymis. **Phase 2:** Develop a protocol for vitrification of the tail of the epididymis of domestic cats for the recovery of viable sperm, using glycerol and ethylene glycol 40% associated with 0.1M sucrose, using that of equilibrium vitrification with the surface vitrification technique solid (SSV). In **Phase 1** among osmolarities, the motility of 325 mOsm did not differ statistically with epididymal fluid (fresh control) in the three times and at 375 mOsm in T0 and T1, and both did not present statistical differences between themselves and between times in all parameters spermatic. The use of 4% glycerol in a diluter with 375 mOsm was superior, showing motility of  $25\% \pm 6$ , vigor 4, plasma membrane integrity of  $48\% \pm 9$  after freezing, did not show statistical differences with the cooling step and in morphology, no statistical differences were found between the two osmolarities in all stages of freezing. In **Phase 2**, Ethylene glycol treatment had better results for all sperm motility parameters (Motility, Vigor, CASA) compared to glycerol ( $P < 0.05$ ). There were no statistical differences in the parameters of plasma membrane and acrosome integrity (Trypan blue and Giemsa), plasma membrane integrity using also (fluorescent dyes Hoechst and propidium iodide) and in normal sperm morphology before and after vitrification between the experimental. The results of the present study showed that Tris-citrate with 325 and 375 mOsm between the tested osmolarities and post-freeze with 375 mOsm and glycerol 4% maintained the sperm parameters, and was successful in vitrifying the tail of the epididymis with 40% ethylene glycol associated with sucrose (0.1 M), of epididymal sperm from domestic cats.

**Keywords:** Cryopreservation, Epididymis Sperm, Feline.

## SUMÁRIO

Pág.

<b>RESUMO</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>1. CONTEXTUALIZAÇÃO</b>	<b>11</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Espermatozoides do Epidídimo</b>	<b>13</b>
<b>2.2 Técnicas para a recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo</b>	<b>15</b>
<b>2.3 Criopreservação de espermatozoides da cauda do epidídimo</b>	<b>16</b>
<b>2.4 Congelação de espermatozoides da cauda do epidídimo</b>	<b>17</b>
<b>2.5 Vitriificação de espermatozoides da cauda do epidídimo</b>	<b>21</b>
<b>2.6 Agentes Crioprotetores intracelulares e extracelulares</b>	<b>22</b>
<b>2.7 Glicerol</b>	<b>23</b>
<b>2.8 Etilenoglicol</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>24</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b>	<b>24</b>
<b>3.2 Objetivos Especificos</b>	<b>24</b>
<b>4. CAPÍTULO 1 :Efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato da congelação com etilenoglicol ou glicerol de espermatozoides epididimários de gato doméstico (Felis catus)</b>	<b>26</b>
<b>5. CAPÍTULO 2: Epididymal tail vitrification as an effective method for feline sperm cryobanking</b>	<b>1</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>34</b>

## 1. CONTEXTUALIZAÇÃO

Em decorrência de inúmeros impactos ambientais e da degradação de Habitats, todas as espécies de felinos selvagens encontram-se em algum grau de ameaça de extinção (ICMBio 2018; IUCN 2019). As técnicas de reprodução assistida como, a criopreservação de gametas e tecidos, insseminação artificial, fertilização *in vitro* e transferência de embriões, são importantes alternativas para conservação de felídeos e restauração da biodiversidade (RIJSSELAERE E VAN SOOM, 2010). Pois, a maioria das populações felinas em cativeiro possuem poucos exemplares aptos a reprodução no que resulta em baixa variabilidade genética (WILDT et al., 2010). Diante deste cenário, é imprescindível adotar medidas para conservação do material genético, objetivando promover a restauração do número de exemplares de vida livre ou de cativeiro. As técnicas de reprodução assistida são uma importante ferramenta para o enfrentar os desafios do manejo reprodutivo, e, com isso poderá auxiliar na conservação dessas espécies (ANDREWS et al., 2018).

Um importante meio de aperfeiçoamento dessas técnicas reprodutivas, é o uso do gato doméstico como modelo experimental (KUNKITTI et al., 2017), que são considerados animais de companhia e tornaram-se o primeiro modelo experimental de aproximadamente 36 espécies de felinos selvagens ameaçados de extinção. Esses animais produzem espermatozoides viáveis, com motilidade espermática progressiva durante todo o ano, facilitando na obtenção de material biológico (BAILLIE et al., 2004). Além de tudo, dentre as espécies de felídeos, é a única que não está ameaçado de extinção (LUVONI, 2006; PUKAZHENTI et al., 2006).

No tocante as biotecnologias da reprodução empregadas em gato doméstico, a recuperação dos espermatozoides do epidídimo, possibilita preservar a fertilidade de animais que vieram a óbito ou necessitaram da remoção cirurgica dos testículos, além de criar novas oportunidades para programas de melhoramento artificial contribuindo para a preservação de felinos ameaçados de extinção (VILLAVERDE et al., 2009, LUVONI, 2013; VERNOCCHI et al., 2014). Após recuperados esses espermatozoides conseguem manter sua capacidade de fertilização a fresco e podendo ser criopreservados, no entanto, a qualidade dos espermatozoides diminui durante o período de resfriamento (TEBET et al., 2006). Portanto, há uma necessidade de estudos que busquem aprimorar a criopreservação, minimizando o tempo de manipulação e de resfriamento para o espermatozoide epididimário de gato.

A técnica de criopreservação permite o armazenamento a longo prazo de gametas e

tecidos, facilitando o transporte longas distâncias e a formação de um banco germoplasma, essencial para a conservação de espécies. É uma importante ferramenta complementar de conservação para evitar perdas excessivas de variação genética ou raças de extinção (VILLAVARDE et al., 2009).

A criopreservação, baseia-se na manutenção do material biológico sob baixas temperaturas, de 4°C a -196°C (nitrogênio líquido), sendo representada pelas técnicas de: congelamento lento, rápido e vitrificação (ISACHENKO et al., 2015). Na célula espermática, a congelamento lento é mais utilizada, no qual há a diminuição gradual da temperatura utilizando freezers programáveis, a congelamento ultra-rápido utiliza o vapor de nitrogênio para que ocorra o resfriamento mais rápido das células (DI SANTO et al., 2012). Para a vitrificação são utilizadas duas técnicas a de equilíbrio e a cinética, onde a de equilíbrio requer altas concentrações de agentes crioprotetores intracelulares (CPA) em soluções de vitrificação para alcançar o estado vítreo, mas se mostrou inadequada para as células espermáticas, devido à exposição direta das soluções aos espermatozoides, o que leva ao desequilíbrio osmótico, mutagênese e morte celular (ISACHENKO et al., 2003; PETRUNKINA, 2007;). Por esses motivos, a vitrificação cinética livre por CPA intracelular foi aplicada especificamente ao espermatozoides (SLABBERT et al., 2014), feita com a exposição direta ao nitrogênio líquido (VUTYAVANICH et al., 2010, PRENTICE & ANZAR, 2011). No entanto essas técnicas podem acarretar na diminuição da viabilidade dos espermatozoides, devido ao estresse térmico, choque osmótico e estresse oxidativo (HERMANSSON; AXNÉR, 2007; GOSDEN, 2011).

Uma importante alternativa para o sucesso das técnicas de criopreservação é a redução do estresse osmótico e a manutenção dos espermatozoides da cauda do epidídimo em um ambiente com a osmolaridade apropriada, pois, durante as etapas de criopreservação ocorrem alterações no gradiente osmótico dos espermatozoides, devido ao contato direto com os agentes crioprotetores (ACPs) GUTHRIE et al., 2002; WEI SI et al., 2006).

Que fazem com o que as células sofram desidratação gerando um efluxo de água e eletrólitos, devido à alta osmolaridade dos ACPs, isto pode levar a diminuição da motilidade e ruptura de membrana plasmática (KUNKITTI et al., 2017). Diante disso, o ajuste da osmolaridade do diluidor durante a fase de resfriamento pode ser capaz de garantir um ambiente mais adequado a células espermáticas, assim como a manutenção desses espermatozoides ainda no lúmen da cauda do epidídimo durante a vitrificação de equilíbrio para evitar o contato direto às soluções de vitrificação.

Hipoteticamente, a congelação dos espermatozoides da cauda do epidídimo com o meio diluidor Tris- citrato com osmolaridade apropriada pode permitir maiores taxas nos parâmetros espermáticos pós congelação utilizando glicerol ou etilenoglicol como crioprotectores intracelulares, assim com também criar um protocolo de vitrificação de equilíbrio que mantenham os espermatozoides ainda no ambiente epididimal de forma, que a parede do epidídimo e seu conteúdo intraluminal seria uma barreira protetora entre os espermatozoides e os crioprotectores intracelulares e extracelulares, assim como assegura à permanência dessas células no fluido epididimário durante todo o processo, de modo a evitar ou minimizar o choque osmótico e estresse oxidativo.

Diante disso, é fundamental o estabelecimento de protocolos eficazes para a congelação de espermatozoides da cauda do epidídimo e para a vitrificação da cauda do epidídimo, com a utilização de meios diluidores, agentes crioprotectores e técnicas adequadas. De forma a minimizar ao máximo os efeitos deletérios ocasionados pela criopreservação, obtendo espermatozoides com alta qualidade reprodutiva, fornecendo embasamento teórico para serem utilizados em estudos posteriores para felinos em risco de extinção.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1. Espermatozoides do epidídimo**

Independentemente do método de recuperação de espermatozoides epididimários de gatos, é bastante fácil realizar a recuperação e pode ser feita logo após a castração ou após a morte do animal para fins de pesquisa e para conservar materiais genéticos de felinos selvagens (VIZUETE et al., 2014). Para uma recuperação de espermatozoides com qualidade fecundante é importante manter os testículos ainda ligados ao epidídimos ou manter os epidídimos dissecados em temperaturas controladas até a recuperação e preservação dos espermatozoides epididimários (MANEE-IN et al., 2014).

Estudos demonstram que existe um tempo máximo adequado para manter os espermatozoides e tecidos inteiros antes da recuperação do esperma, sem afetar nos resultados pós congelação. Deve-se manter os epidídimos a 4-5 ° C, o tempo máximo varia entre menos de 12 horas (HAY & GOODROWE, 1993) a 24 horas (ganán et al., 2009; TOYONAGA et al., 2010, 2011b). É importante que sejam mantidos refrigerados, pois, a qualidade espermática começa diminuir drasticamente após 12 horas de armazenamento a

temperatura ambiente (20 ° C) (TOYONAGA et al., 2011a).

A produção espermática nos mamíferos inicia-se no testículo e a maturação dos espermatozoides ocorre no epidídimo. Essa estrutura é um tubo longo, enrolado sobre si, que atua como local extragonadal para armazenamento de reserva de espermatozoides. Dividi-se em cabeça, corpo e cauda, nos gatos, em relação ao testículo, a cabeça do epidídimo fica localizada dorso cranialmente, o corpo na porção dorso lateral e a cauda na região dorso caudal, sendo dividido em cabeça, corpo e cauda (JOSEP et al., 2009). A cauda do epidídimo passa medialmente sobre a superfície testicular e posteriormente dá início ao ducto deferente, que irá desembocar na uretra, permitindo assim a passagem das células espermáticas para o meio exterior (JOHNSTON, et al., 2001).

Entre as funções do epidídimo, destaca-se: maturação e armazenamento espermático, e eliminação de possíveis espermatozoides anormais e capacidade de fertilização (JERVIS & ROBAIRE 2001). O epitélio do epidídimo secreta proteínas as quais são responsáveis por promoverem um ambiente ideal para as células, fornecendo temperatura, pH, substrato energético e quantidade de oxigênio compatível com a maturação dos espermatozoides, todas esses fatores fazem com o que os espermatozoides adquiram a capacidade de reconhecimento e conexão com o oócito (BELLEANNEE et al 2012). E durante todo o percurso no epidídimo, os espermatozoides passam por diversas alterações morfofuncionais, tais como: migração da gota citoplasmática da região proximal para a distal, início do ganho da motilidade progressiva e habilidade de reconhecimento e ligação ao oócito (JERVIS et al., 2001, KEDAM et al., 2016). A composição do fluido do epidídimo também é modificada durante o percurso dos espermatozoides, como os tipos de proteínas existentes, a proporção iônica e as reservas energéticas presentes. E o controle da secreção e absorção dos fluidos é feito pelas células do epitélio epididimários. Essas mudanças possibilitam um microambiente especializado para que o processo de maturação espermática seja completado (GATTI et al, 2004, FRANÇA et al., 2005).

O processo de remoção de espermatozoides defeituosos ocorre principalmente na cauda do epidídimo, onde ocorre uma maior taxa de fagocitose e dissolução celular. Esse processo elimina boa parte das células defeituosas, como, espermatozoides com cabeça piriforme, estreita na base, pequena, anormal ou subdesenvolvida (KEDAM et al., 2016). E na cauda do epidídimo é onde os espermatozoides já maturados são estocados durante vários dias, e são liberados somente no momento da ejaculação, quando sofrerão capacitação no trato reprodutor feminino (AXNÉR, 2004). Tal funcionalidade pode ser

justificada pelo reduzido metabolismo das células espermáticas, o que evita sua ativação prematura (KEDAM et al., 2016).

Dessa forma os, espermatozoides provenientes da cauda são geralmente de boa qualidade e com alto nível de maturidade e são capazes de fertilizar oócitos. A recuperação de espermatozoides da cauda do epidídimo é uma excelente alternativa para a formação de bancos de germoplasma de animais de alto interesse comercial ou ameaçados de extinção (COCCHIA *et al.*, 2009; VARESI, 2012).

## **2. 2. Técnicas para a recuperação dos espermatozoides do epidídimo**

Para recuperação de espermatozoides epididimários, se faz necessária a utilização de técnicas adequadas a cada espécie, o que possibilitará a preservação dos espermatozoides para a formação de bancos de germoplasma e utilização em programas de reprodução assistida (MANEE-IN et al., 2014).

A técnica de fatiamento seguido de flutuação é tem sido utilizadas em pequenos animais, inclusive no gato. Após a orquiectomia e obtenção do complexo testículo-epidídimo, é realizada a dissecação e separação do epidídimo do testículo, em seguida são realizados cortes no epidídimo e um diluidor é adicionado sobre os fragmentos no intuito de os espermatozoides flutuarem para o meio de diluição e facilitarem sua recuperação (KASHIWAZAKI et al., 2005; THUWANUT E CHATDARONG, 2009a; MANEE-IN et al., 2014; VIZUETE et al., 2014).

A técnica de compressão, também é utilizada em pequenos animais. Logo após a orquiectomia dos animais e dissecação do epidídimo, é feito o isolamento da cauda do epidídimo e parte do ducto deferente. Em seguida, com auxílio de uma pinça hemostática ou lâmina de vidro, são feitas compressões do epidídimo em direção ao ducto deferente para colheita do fluido epididimal em placa de Petri já com o diluidor (LUVONI et al., 2002). É utilizada também a técnica de perfuração com agulha de calibre 29 (BOGLIOLO et al., 2001; SIEMIENIUCH E DUBIEL, 2007), e com uma agulha de calibre 30 (STACHECKI et al., 1994). São feitas várias perfurações na cauda do epidídimo para a recuperação dos espermatozoides em um meio diluidor (SIEMIENIUCH E DUBIEL, 2007).

Comparando esses métodos, o fatiamento seguido de flutuação e a técnica mais utilizada em felinos domésticos, embora as amostras de espermatozoides são contaminadas com eritrócitos, leucócitos e outras células (CHATDARONG et al., 2010b) que podem prejudicar a sobrevivência e fertilização dos espermatozoides frescos e criopreservados

(RIJSSELAERE et al., 2004; VERBERCKMOES et al., 2004). Para minimizar os danos pela contaminação após a recuperação é feita a centrifugação das amostras coletadas e diluídas em meio de manutenção sendo posteriormente feita a ressuspensão do sedimento com com diluidor seminal de escolha para melhorar a qualidade espermática (CHATDARONG et al., 2010b).

### **2. 3. Criopreservação de espermatozoides da cauda do epidídimo**

A criopreservação dos espermatozoides epididimários, é um método de preservação importante quando se tem animais que passaram pelo processo esterilização cirúrgica ou que vieram a óbito, devido à possibilidade de armazenamento por tempo indeterminado e a transporte de material genético entre localidades distantes (VARESI, 2012).

A criopreservação, ou preservação pelo frio utiliza temperaturas acima e abaixo do ponto de fusão dos líquidos para a conservação de células espermáticas (LUVONI et al., 2003). O processo de criopreservação espermática possibilita a utilização por longos períodos e auxilia no transporte de material genético entre locais distantes (CASTELO et al., 2008). A criopreservação pode ser realizada por técnicas, tais quais: congelação e a vitrificação.

### **2. 4. Congelação de Espermatozoides da Cauda do epidídimo**

O processo de congelação é caracterizado pela utilização de baixas concentrações de agentes crioprotetores (ACP) e envolve a etapa de diluição, refrigeração e congelação. A diluição é feita após a recuperação dos espermatozoides da cauda do epidídimo com a adição de um meio extensor, a refrigeração é a diminuição gradativa da temperatura dos espermatozoides diluídos em refrigerador até atingir 4 ou 5 ° C. Em seguida os espermatozoides são expostos ao vapor de nitrogênio e armazenados em botijões criogênicos (SRIPUNYA, 2010). A congelação pode ser lenta (tradicional) ou rápida. A congelação lenta, é feita pela redução gradual da temperatura em refrigerador convencional ou controlada por um freezer programável (MUKAIDA et al., 2003; NAIK et al., 2005), seguido do armazenamento em nitrogênio líquido (CHIAN et al., 2004, SRIPUNYA, 2010). Já o congelamento rápido, os espermatozóides são misturados no diluidor já com o agente crioprotetor e são envasados em palhetas ou colocados em criotubo e posteriormente expostos para o resfriamento em vapor de nitrogênio líquido por pelo menos 10 minutos antes de serem mergulhados em nitrogênio líquido e congelados (DI SANTO et al., 2012).

Estudos compararam a congelação lenta com métodos de congelamento rápido (VUTYAVANICH et al., 2010; TONGDEE et al., 2015), e observaram que há uma maior



taxa de deterioração da cromatina dos espermatozoides no processo de congelação rápida comparado com a congelação lenta (HAMMADEH et al., 2001). A congelação lenta ainda é a mais empregada em espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos domésticos (tabela 1). *In vivo*, foram observadas taxas de concepção de 80% de fêmeas inseminadas artificialmente com espermatozoides epididimários submetidos à resfriamento e congelação (TOYONAGA et al., 2011b). Por meio da criopreservação utilizando espermatozoides epididimários de gatos foi possível a produção *in vitro* de embriões, com taxas de clivagens e blastocistos de 53% com 30%, respectivamente (ZAMBELI et al., 2008). Adicionalmente, Bogliolo et al. (2001) obtiveram 82% de clivagem e 7% de produção de blastocistos após injeção intracitoplasmática de espermatozoides.

E durante o processo de criopreservação, os espermatozoides são expostos a diversos fatores estressantes, que podem estar ligados ao choque térmico ocasionado por baixas temperaturas que levam a rupturas das membranas acrossomais (TEBET, 2004), à formação de cristais intracelulares de gelo ou ao choque osmótico durante a congelação e descongelação, além do estresse ligado à adição e ação do crioprotetor (HOLT, 2000). Pode levar também à alterações que simulam uma capacitação, decorrentes do choque térmico, que podem levar à alteração da motilidade levando a uma reação culminar acrossômica impossibilitando a fertilização *in vivo*, menor capacidade de fertilização e *in vitro* após a injeção espermática intra-citoplasmática (PUKAZHENTHI et al., 2001). Dessa forma é necessário o uso de diluidores para criopreservação espermática, de uma forma geral, devem ter pH adequado, capacidade de proteção e manutenção da viabilidade celular, osmolaridade adequada e, ainda, capacidade de proteger o espermatozoide de injúrias criogênicas (SALAMON & MAXWELL, 2000).

A utilização de meios diluidores com soluções tampões auxiliam na manutenção do pH, pois devido ao acúmulo de ácidos lácticos no meio extracelular oriundos do metabolismo espermático, levam a uma redução do pH, podendo provocar morte dos espermatozoides (HOLT, 2000). Dessa forma, substâncias tampão, como o citrato de sódio, TRIS (trishidroximetilaminometano) ou TES (ácido N-trishidroximetil-metil-2-aminometano-sulfônico) têm sido bastante utilizados com sucesso na preservação de espermatozoides da cauda do epidídimo em gatos (BURANAAMNUAY, 2015; KLAUS et al. 2016) (tab. 1). O uso de meios diluidores comerciais, como o Botu-crio® e o Tryladyl para a congelação de espermatozoides felinos demonstraram ser uma opção prática e viável (MACENTE et al., 2012; JIMENEZ et al., 2013) (tab. 1). No entanto, foi observado nessa

revisão que ainda não foi encontrado um diluidor ideal para a congelação de espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos.

**Tabela 1.** Estudos com congelação de espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos *Felis catus*.

<b>Diluidor utilizado</b>	<b>Glicerol</b>	<b>Motilidade</b>	<b>Integridade de membrana plasmática</b>	<b>Referências</b>
Botu-crio®	5%	23,7%	47,1	Macente (2012)
Gema de Ovo	3%	31.8%	32, 2 %	Kashiwazaki et al. (2005)
PBS	3 %	60.5%	51,7%	Axner et al. (2004)
PBS	6%	50%	-	Karja et al. (2002)
Tes – Tris	7,5%	53%	-	Lengwinat and Blottner (1994)
Tes – Tris	7,5%	65%	-	Schafer and Holzmann (2000)
Tes - tris Gema de ovo	10%	52,9%	-	Stachecki et al. (1994)
Tes - tris Gema de ovo	10%	52.9 %	-	Thuwanut et al. (2010)
Tes - tris Gema de ovo	7%	50%	-	Klaus et al. (2016)
TEY ®	7%	38,6%	50%	Toyonaga and Tsutsui

				(2012)
TEY®	7%	40 %	63.3%	Toyonaga et al. (2010, 2011a, 2011b)
Triladyl®	4%	57%	72%	Jimenez et al. (2013)
Tris	10%	29%	69%	Buranaamnuay (2013)
Tris	10%	20%	62,6%	Buranaamnuay (2015)
Tris	3%	31%	49%	Chatdarong et al. (2009)
Tris	4%	32%	45%	Cocchia et al. (2009)
Tris	4%	40%	-	Ganan et al. (2009)
Tris	7%	40%	45%	Kunkitti et al. (2016a,b)
Tris	3%	51%	67%	Manee-in et al. (2014)
Tris	8%	40%	49%	Martins et al. (2009)
Tris	4%	57,5%	62%	Siemieniuch and Dubiel (2007)
Tris	7%	59%	53%	Tebet et al. (2006)
Tris	7%	40%	39,6%	Thuwanut et al. (2009b)
Tris	7%	24%	52%	Tsutsui et al. (2003)
Tris	3%	39%	51%	Thuwanut et al. (2008)

---

## 2. 5. Vitrificação de espermatozoides da cauda do epidídimo

Diferentemente da congelação, a vitrificação é um método mais rápido (20.000 a 40.000°C/min) (LIN et al., 2008), simples e menos oneroso não requer equipamentos especiais podendo ser realizado à campo. A vitrificação foi desenvolvida por Luyet em 1937, e somente após quase 50 anos, ela foi descrita pela primeira vez por Rall e Fahy (1985), como uma alternativa ao processo de congelamento lento.

A vitrificação é uma técnica que se caracteriza na exposição das células espermáticas em contato direto com o nitrogênio líquido. Dividi-se em duas técnicas: Vitrificação de equilíbrio e a Vitrificação cinética. Na vitrificação de equilíbrio utilizam-se soluções viscosas e contendo altas concentrações de ACP e curvas de congelação ultrarápidas, com quedas de temperaturas superiores a 10.000°C/min (CARVALHO et al., 2011). Devido a alta viscosidade da solução de vitrificação, o fluido que permanece no espaço intracelular adquire uma característica vítrea, sem estrutura anatômica definida, impedindo a formação de cristais de gelo e acomodando-se bem entre as organelas celulares (VIZUETE et al., 2014). É bastante utilizada para vitrificar tecidos, folículos ovarianos, oócitos e embriões (DOMINGUEZ et al., 2013).

No entanto, esta técnica mostrou-se inadequada para espermatozóides devido aos seus efeitos osmóticos e citotóxicos letais por conta do contato direto dos espermatozoides a altas concentrações de crioprotetores (ISACHENKO et al., 2003). Evidenciando a necessidade de desenvolver protocolos capazes de evitar que esse contato direto as soluções crioprotetoras, para que seja possível utilizar essa técnica de vitrificação que já é bem estabelecida em outros tipos de amostras biológicas.

A vitrificação cinética, não é necessário o uso de crioprotetores permeáveis utilizando somente altas taxas de resfriamento, sendo possível dessa forma vitrificar a amostra, esta é a alternativa mais viável encontrada para vitrificar espermatozoides, visto que o contato direto com altas concentrações de ACP apresentam toxicidade aos espermatozoides (FAHY et al., 1984). E já está bem estabelecida para a criopreservação de sêmen em humanos (SLABBERT et al., 2015) e apresenta bons resultados em sêmen por exemplo de coelhos, cães e em gatos (ROSATO E IAFFALDANO, 2013; CATURLA-SÁNCHEZ et al., 2018; SWANSON et al., 2017). No tocante aos espermatozoides da cauda do epidídimo, a vitrificação cinética já foi descrita em carneiros da raça Muflon (BÓVEDA et al., 2018) em gatos domésticos (VIZUETE et al., 2014).

## **2.6. Agentes Crioprotetores intracelulares e extracelulares (ACPs)**

Os ACPs são agentes químicos utilizados para proteger as células durante o processo de criopreservação para evitar a formação de cristais de gelo, desidratação, resfriamento e danos causados pela redução extrema de temperatura como o choque térmico e osmótico e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada (PURDY, 2006). São divididos em intracelulares e extracelulares.

Os ACPs intracelulares, tem a capacidade de penetrar com facilidade as membranas das células, tem a função formar pontes de hidrogênio com moléculas de água intracelular substituindo parcialmente essas moléculas, prevenindo assim, a cristalização de gelo por reduzir o ponto de congelação rearranjando lipídios e proteínas de membrana (PURDY, 2006; MARQUES, 2008).

ACPs intracelulares são divididos em dois grupos: alcoólicos e amidas (ALVARENGA et al., 2005). Dentre os crioprotetores alcoólicos utilizados para a preservação espermática, destacam-se, o glicerol, o etilenoglicol e o Dimetilsofóxido (DMSO) (FICKEL et al., 2007); entre as amidas, são utilizadas a acetamida, a lactamida (KASHIWAZAKI et al., 2006), a dimetilformamida (OLIVEIRA et al., 2006).

Os ACPs extracelulares não penetram nas células, ou seja permanecem no meio extracelular, protegendo o material biológico. Tem a função de causar a desidratação da célula fazendo, com isto, a retirada de água de dentro da célula, aumentando a concentração de ACP intracelular e reduzindo a formação de cristais de gelo (NUNES, 2002; VANSANDT et al. 2016). Além de protegerem as membranas celulares, por meio de sua ligação aos grupos de fosfolipídios, de forma à manter a estabilidade da membrana plasmática; além de aumentar a viscosidade do meio, diminuindo a concentração de eletrólitos durante a criopreservação (DI SANTO et al., 2012). Os ACPs extracelulares, são representados por macromoléculas com peso molecular elevado, tais como açúcares complexos (rafinose, trealose), lipoproteínas da gema do ovo, água de coco, leite, alguns aminoácidos e lecitina de soja (NUNES, 2002, DI SANTO et al., 2012; VANSANDT et al. 2016).

## **2.7. Glicerol**

O glicerol é o ACP intracelular mais frequentemente utilizado para a criopreservação de espermatozóides do epidídimo de gatos domésticos, embora esta substância seja prejudicial à células especialmente em altas concentrações (VILLAVERDE et al., 2013). A concentração final de glicerol incluída nos extensores para criopreservação de

espermatozoides do epididímo de gatos não é o mesmo entre diferentes estudos, variando de 3%, 7% e 10%, o glicerol nessas concentrações possuem taxas de (30% a 60%) motilidade espermática por congelamento (BURANAAMNUAY, 2015; THUWANUT et al. 2009b). Estudos sugerem que na criopreservação o glicerol deve atingir 5% na concentração final, de acordo com relatórios anteriores, pesquisadores adicionaram no meio de congelação o glicerol em duas etapas de diluição (isto é, 3% e 7% de glicerol, respectivamente) (AXNER et al. 2004; CHATDARONG et al. 2009).

No entanto, ACPs são tóxicos em concentrações mais altas e que a vitalidade do espermatozoide diminuiu drasticamente com meios de congelação suplementado com altas concentrações destes agentes (GILMORE et al., 1997).

O glicerol apesar do seu resultado na criopreservação de espermatozoides, ainda pode causar toxicidade à célula espermática, pode causar desnaturação de proteínas, modificação nas interações de actina o que provavelmente interfere no deslizamento das fibras densas da cauda do espermatozoide, pode levar à alterações no glicocálice e nas proteínas da superfície celular, que interferirá durante o reconhecimento dos receptores da zona pelúcida no momento da fecundação (ALVARENGA et al. 2000). Em consequência deste efeito tóxico, trabalhos em espécies de mamíferos, visam substituir o glicerol por outro crioprotetor que também seja eficaz e menos nocivo à célula espermática (BHATTACHARYA, 2018; FERNANDES et al., 2002).

## **2. 8. Etilenoglicol**

O Etilenoglicol (monoetileno glicol; etano-1, 2-diol) é um álcool com dois grupos-OH, um composto químico largamente utilizado como um anticongelante automotivo. E tem sido utilizado devido a sua capacidade crioprotetora, promovendo maior proteção do acrossoma e das membranas espermáticas de espermatozoides ovinos, quando comparado ao glicerol (BHATTACHARYA, 2018). O etilenoglicol possui uma alta capacidade crioprotetora e uma rápida penetração celular de baixo peso molecular 62 g/mol, tem sido empregado na criopreservação dos espermatozoides (FERNANDES et al., 2002), em decorrência de sua menor toxicidade e alta permeabilidade celular (BHATTACHARYA, 2018). Em um trabalho com criopreservação seminal de cães, Rota et al. (2006) demonstraram que o etilenoglicol melhora significativamente a qualidade do sêmen canino no descongelamento em comparação com glicerol. Entretanto assim como o glicerol se

utilizado em altas concentrações promove um efeito deletério as células espermáticas (BHATTACHARYA, 2018).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

O objetivo do estudo foi investigar o efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato acrescido de glicerol ou etilenoglicol na congelação de espermatozóides epididimários e realizar a vitrificação de equilíbrio de toda a cauda do epidídimo, para recuperação de espermatozoides viáveis de gatos domésticos (*Felis catus*).

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato em espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*).

- Avaliar o efeito da congelação utilizando o diluidor Tris-citrato na melhor osmolaridade encontrada com gema de ovo, glicerol 4% ou etilenoglicol 3 e 6% em espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*).

- Desenvolver um protocolo de Vitrificação da cauda do epidídimo para a recuperação espermatozoides de gatos domésticos, com glicerol e etilenoglicol associados de sacarose com a técnica de vitrificação em superfície sólida (SSV).

## Capítulo 1

**Efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato da congelação com etilenoglicol ou glicerol de espermatozoides epididimários de gato doméstico (*Felis catus*)**

*Effect of different osmolarities of Tris-citrate extender and freezing with ethyleneglycol or glycerol of epididymal sperm from domestic cat (*Felis catus*)*



Publicado: Rev Bras Reprod Anim v.43, n.3, p.779-786, jul./set. 2019.

<sup>1</sup>Correspondência:

[Silmaraleticiagl@gmail.com](mailto:Silmaraleticiagl@gmail.com)

Recebido: 26 de março de 2018.



## **Efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato na congelação com etilenoglicol ou glicerol de espermatozoides epididimários de gato doméstico (*Felis catus*)**

*Effect of different osmolarities of Tris-citrate extender on freezing epididymal sperm from domestic cat (*Felis catus*) with ethyleneglycol or glycerol*

**Silmara Letícia Gonçalves Lima<sup>1</sup>, Daniele Calado Brito, Juliana Gonçalves Lima, Marcela da Silva Cordeiro, Sheyla Farhayldes Souza Domingues**

Universidade Federal do Pará, Laboratório de Biotecnologia da Reprodução e Medicina dos Animais da Amazônia, Castanhal, Pará, Brasil.

### **Resumo**

Objetivou-se com o estudo investigar o efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato em espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*) e a congelação com glicerol ou etilenoglicol. Foram realizados dois experimentos, com 10 gatos. No Experimento 1, avaliou-se a manutenção dos parâmetros espermáticos em diluidor tris-citrato com osmolaridades 275, 325, 375, 425, 475 e 525 mOsm, nos tempos (T0= 0, T1= 30 e T2= 60 min). No Experimento 2 a congelação foi realizada utilizando as osmolaridades 325 e 375 do glicerol a 4% ou etilenoglicol a 3%, 6%. Dentre as osmolaridades, quanto à motilidade a 325 mOsm não diferiu estatisticamente com o fluido epididimal (controle) nos três tempos e a 375 mOsm no T0 e T1, e ambas não apresentaram diferenças estatísticas entre si e entre os tempos em todos os parâmetros espermáticos. O uso de 4% de glicerol em diluidor com 375 mOsm foi superior, apresentando motilidade de 25% ± 6, vigor 4, integridade de membrana plasmática de 48% ± 9, sem diferenças estatísticas com o resfriamento e na morfologia não foram encontradas diferenças estatísticas entre as duas osmolaridades. Portanto, o Tris-citrato com 325 e 375 mOsm entre as osmolaridades testadas e pós congelação com 375 mOsm e glicerol 4% manteve os parâmetros espermáticos.

**Palavras-chave:** criopreservação, cauda do epidídimo, felino.

### **Abstract**

*The aim of this study was to investigate the effect of different osmotic potentials of Tris-citrate extender in epididymal spermatozoa of domestic cats (*Felis catus*), frozen with glycerol or ethyleneglycol. Two experiments were carried out, with ten cats. In the first experiment, the influence of extender with the osmolarity of 275, 325, 375, 425, 475 and 525 mOsm on sperm parameters were evaluated. In the second experiment, slow freezing was performed using glycerol at 4% or ethyleneglycol at 3% and 6% added to extender with 325 and 375 mOsm. Among the osmolarities, the motility at 325 mOsm did not differ statistically with epididymal fluid (control) at all times evaluated and at 375 mOsm at T0 and T1, and both showed no statistical differences between each other and between the times in all sperm parameters. Glycerol 4% added to extender with 375 mOsm was superior, presenting motility of 25% ± 6, vigor 4, plasma membrane integrity of 48% ± 9, without statistical differences with cooling and in morphology, no statistical differences were found between the two osmolarities. Therefore, 325 and 375 mOsm Tris-citrate between the osmolarities tested and after freezing with 375 mOsm and 4% glycerol maintained the sperm parameters.*

**Keywords:** *criopreservation, epididymis-tail, feline*

### **Introdução**

A recuperação e congelação de espermatozoides provenientes da cauda do epidídimo são biotécnicas de reprodução que visam a formação de reservas genéticas de animais com alto valor zootécnico ou ameaçados de extinção e que porventura vieram à óbito (Chatdarong et al., 2009). Entretanto, o emprego de espermatozoides epididimários em técnicas de reprodução assistida ainda está em aprimoramento. Em se tratando do gato doméstico (*Felis catus*), essas biotécnicas podem ser de grande importância para a conservação de recursos genéticos de espécies felíneas selvagens

<sup>1</sup>Correspondência: [Silmaraleticiagl@gmail.com](mailto:Silmaraleticiagl@gmail.com)

Recebido: 26 de março de 2018

Aceito: 13 de setembro de 2019



ameaçadas de extinção, uma vez que o gato doméstico é o único felídeo que não está listado como ameaçado (Andrews et al., 2018), sendo, portanto, um importante modelo experimental, pela possibilidade de transpor protocolos bem-sucedidos para outras espécies felídeas (Rijsselaere e Van Soom, 2010).

Estudos empregando espermatozoides epididimários de gato doméstico em técnicas de reprodução assistida têm apresentado resultados promissores, tais como a manutenção de capacidade fecundante de espermatozoides descongelados, resultado comprovado por meio de produção *in vitro* de embriões, quando foi possível alcançar taxas de clivagens e blastocistos de 53% com 30%, respectivamente (Zambeliet al., 2008). Assim como *in vivo*, foi relatada uma taxa de concepção de 80% de fêmeas inseminadas artificialmente com espermatozoides epididimários submetidos à resfriamento e congelação (Toyonaga et al., 2011).

Entretanto, um dos fatores cruciais para a manutenção e viabilidade da célula espermática epididimária é a característica físico-química da solução diluidora. O processo de congelação promove alterações na osmolaridade celular, devido à exposição a meios hiperosmóticos decorrentes, resultando no efluxo de água com consequente desidratação da célula e possível influxo de íons (Guthrie et al., 2002; Wei Si et al., 2006) que levam, principalmente, à redução da motilidade espermática (Kunkitti et al., 2017). Quando essas células são submetidas a meios isosmóticos ou até mesmo hiposmóticos durante a descongelação, um rápido influxo de água resulta em injúrias físicas, como ruptura de membrana plasmática (Wei Si et al., 2006).

Portanto, as características osmóticas do diluidor podem apresentar grande importância para o sucesso da manutenção e viabilidade celular. Os espermatozoides no epidídimo estão em um meio hiperosmótico em comparação ao sêmen (Robaieret al., 2006) e a maioria dos diluidores empregados em espermatozoides epididimários de gatos domésticos utilizam osmolaridade de 307 mOsm/L, similar à do sêmen (Glover & Watson, 1985; Emerenciano et al., 2013). Demonstra-se dessa forma, a necessidade de estudos que estabeleçam a osmolaridade do diluidor mais apropriada para a manutenção dos espermatozoides epididimários, bem como o efeito dessas soluções no sucesso da congelação quando associado com crioprotetores intracelulares, tais como o glicerol e etilenoglicol.

O glicerol, nas concentrações 4% ou 5%, é o agente crioprotetor intracelular mais utilizado na criopreservação de espermatozoides de gatos doméstico (Villaverde et al., 2013). O etilenoglicol possui uma alta capacidade crioprotetora, baixo peso molecular e uma rápida penetração celular, tendo sido empregado na criopreservação dos espermatozoides (Silva et al., 2012) em decorrência de sua menor toxicidade devido sua alta permeabilidade celular (Bhattacharya, 2018).

Objetivou-se com o presente trabalho investigar o efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato acrescido de glicerol ou etilenoglicol na congelação de espermatozoides epididimários de gatos domésticos (*Felis catus*).

## Material e Métodos

### *Coleta do complexo testículo-cauda do epidídimo*

Os complexos testículo-cauda do epidídimo foram obtidos de dez gatos domésticos (n=10) durante procedimento rotineiro de orquiectomia no hospital veterinário do Campus Universitário de Castanhal (Universidade Federal do Pará) e teve aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA), Nº 1650060516.

*Experimento I:* Efeito de diferentes osmolaridades do diluidor Tris-citrato sobre a motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática de espermatozoides da cauda do epidídimo.

Após a orquiectomia, os complexos testículo-epidídimo de cinco gatos foram imediatamente destinados ao laboratório em placas de Petri previamente esterilizadas, imersos em solução fisiológica (NaCl a 0,9%) pré-aquecida (37°C). Em seguida, foram dissecados para a retirada da cauda do epidídimo e a recuperação dos espermatozoides por meio das técnicas de fatiamento e flutuação, que consistem no fatiamento da cauda com auxílio de um bisturi em seguida é adicionado o diluidor sobre os fragmentos da cauda para a flutuação e recuperação dos espermatozoides (Cary et al., 2004).

Após o fatiamento, foi retirada uma amostra do fluido epididimário para o controle *a fresco*. Os fragmentos fatiados foram separados e colocados em seis microtubos tipo *ependorf* (1,5ml), que continham 1ml de Tris - citrato (Fração A), com as diferentes faixas de osmolaridades (275, 325, 375,



425,475 e 525 mOsm) obtidas por meio da adição de frutose ou de água ultrapura, para o ajuste da osmolaridade. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C e avaliadas em três períodos (T0 = 0, T1= 30 e T2= 60 min). Posteriormente, foi realizada a avaliação microscópica das amostras, que no controle a fresco foi feita somente no tempo T0, uma vez que os parâmetros espermáticos não se mantêm sem a diluição, pois se trata de uma amostra do fluido epididimário.

*Experimento II:* Efeito do diluidor Tris-citrato com diferentes osmolaridades no processo de congelação de espermatozóides epididimários com glicerol ou etilenoglicol

Após o fatiamento da cauda do epidídimo de cinco gatos, foi retirada uma amostra do fluido epididimário de cada animal para o controle à fresco. E para a congelação, os espermatozóides foram recuperados das caudas do epidídimo e diluídos, considerando os melhores resultados do experimento I.

A congelação foi iniciada com a etapa de diluição. Os fragmentos fatiados de cada cauda do epidídimo de cada animal foram colocados em microtubos do tipo *eppendorf* (1,5ml), que continham 1,0 ml de Tris - citrato (Fração A) na melhor ou melhores osmolaridades, em seguida foram retiradas amostras com auxílio de pipetas para a etapa de resfriamento, executado em geladeira numa curva decrescente de temperatura de 37°C para 4°C em um intervalo de 90 minutos (0,4°C/min). Após o resfriamento, as amostras foram subdivididas em grupos: glicerol 4%; etilenoglicol 3% e etilenoglicol 6%. Os crioprotetores foram adicionados à Fração B (Fração A + 20% de gema de ovo) de cada grupo e esta foi adicionada as amostras na proporção 1:1 após o resfriamento das mesmas. Em seguida, as amostras foram envasadas em palhetas de 0,25 ml, lacradas com esferas metálicas de 1,7 mm e expostas ao vapor de nitrogênio (-60 C°) por 20 minutos antes de serem mergulhadas em nitrogênio líquido (-196 °C). Uma semana após a congelação, as amostras foram descongeladas em banho-Maria a 37°C por 30 segundos.

*Avaliação microscópica dos parâmetros espermáticos*

No experimento I, os espermatozoides foram avaliados quanto a motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática, nos tempos T0, T1 e T2. A motilidade e o vigor espermático foram avaliados subjetivamente em microscópio óptico (modelo ECLIPSE E400, Nikon, Japão) e para a integridade de membrana plasmática, foram confeccionadas lâminas as quais foram coradas com 5µl eosina nigrosina a 1% em 5µl da amostra em uma lâmina previamente aquecida (37°C). A avaliação foi feita pela contagem do total de 200 espermatozoides em microscópio óptico, em cada tempo de cada osmolaridade.

No experimento II, foram realizadas as análises espermáticas de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática dos espermatozóides do fluido epididimário à fresco e após todas as etapas do processo de congelação (diluição, resfriamento e congelação), já descritas no experimento I. Também foi avaliada a morfologia espermática, tendo sido contados 200 espermatozoides por amostra em microscópio óptico (modelo ECLIPSE E400, Nikon, Japão), sendo estes classificados como normais ou com defeitos maiores localizados no acrossoma, cabeça e peça intermediria, ou seja, defeitos relacionados a espermatogênese; ou menores presentes na cauda espermática, que são relacionados à via ejaculatória ou manipulação após colheita (Blom, 1973). A concentração foi determinada após a recuperação dos espermatozoides e a diluição, como auxílio de câmara de Neubauer (Hirschmann EM techcolor, Estados Unidos), após diluição (1:100, v: v) das amostras solução formol salina tamponada.

*Análise Estatística*

Os testes estatísticos utilizados foram: moda, para estabelecer o vigor espermático analisado, em uma escala de 0-5; média  $\pm$  desvio padrão, para o percentual dos parâmetros espermáticos; *one-way* ANOVA, para comparação dos tempos em cada osmolaridade e entre os tratamentos das etapas de congelação, e *two-way* ANOVA para analisar diferenças entre as osmolaridades e os tempos entre si. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando  $P < 0,05$ .

## Resultados

No Experimento I, foram avaliados os parâmetros de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática espermática nas diferentes osmolaridades e em três tempos de análise. Quanto a motilidade espermática no fluido epididimário a fresco ( $72 \pm 22$ ), não foram observadas diferenças



( $P > 0.05$ ) em comparação com as osmolaridades 325 no T0 ( $77\% \pm 15$ ) e T1 ( $50\% \pm 36$ ) e T2 ( $43\% \pm 38$ ) e com a 375 mOsm no T0 ( $68\% \pm 17$ ) e T1 ( $45\% \pm 23$ ) (Tab. 1). As amostras diluídas em meio com 325 e 375 mOsm foram significativamente superiores quando comparadas as demais osmolaridades, pois não apresentaram diferenças significativas entre si e em entre os tempos T0, T1 e T2 em todos os parâmetros avaliados (Tab. 1).

Durante o processo de congelação, foram congelados  $4,2 \times 10^6 \pm 0,7$  de espermatozoides recuperados após a diluição nas osmolaridades testadas (325 e 375 mOsm). Após a descongelação, os resultados de motilidade e vigor utilizando glicerol 4% foram semelhantes aos observados nos espermatozoides refrigerados. Além disso, a osmolaridade de 375 mOsm com glicerol 4% também manteve a integridade de membrana plasmática durante todas as etapas desde a diluição e após a congelação e com o fluido epididimário (Tab. 2).

Após a congelação os grupos com etilenoglicol nas duas osmolaridades utilizadas, apresentaram redução significativa na motilidade e no vigor, em comparação com as etapas de diluição e resfriamento (Tab. 2). Todavia, com relação à avaliação da integridade de membrana plasmática, os espermatozóides congelados com etilenoglicol a 6% na osmolaridade de 375 mOsm e a 3% em ambas osmolaridades não apresentaram diferenças estatísticas significativas com o fluido epididimário a fresco e com as etapas de diluição e resfriamento das duas osmolaridades (Tab. 2).

Não foram observadas diferenças estatísticas significativas com relação às taxas de espermatozoides morfológicamente normais entre todas as etapas da congelação e nas duas osmolaridades utilizadas. Dentre as alterações morfológicas encontradas, com exceção da gota citoplasmática proximal, a maioria foi classificada como defeitos menores (Tab. 3).

Tabela 1: Media e Desvio padrão, dos parâmetros de Motilidade, Vigor e Integridade de Membrana Plasmática (ITM) dos espermatozóides da cauda do epidídimo de gatos domésticos nos tempos de incubação T0, T1 e T2, de acordo com as osmolaridades (275, 325, 375, 425, 475 e 525 mOsm) no diluidor Tris-citrato.

Tempo de Incubação	Osmolaridades	Parâmetros Espermáticos		
		%Motilidade	Vigor	%IMP
<b>Fluido Epididimal (T0) 0min</b>		72±21,7 <sup>Aa</sup>	5 <sup>A</sup>	-
	275	64±12 <sup>Aa</sup>	5 <sup>Aa</sup>	71±15 <sup>Aa</sup>
	325	77±15 <sup>Aa</sup>	5 <sup>Aa</sup>	56±29 <sup>Aa</sup>
	375	68±17 <sup>Aa</sup>	4 <sup>Aa</sup>	51±20 <sup>Aa</sup>
	425	60±23 <sup>Aa</sup>	4 <sup>Aa</sup>	57±34 <sup>Aa</sup>
	475	60±33 <sup>Aa</sup>	3 <sup>Aa</sup>	44±37 <sup>Aa</sup>
	525	57±22 <sup>Aa</sup>	4 <sup>Aa</sup>	45±30 <sup>Aa</sup>
<b>(T1) 30min</b>	275	42±8 <sup>Bb</sup>	4 <sup>Aa</sup>	45±25 <sup>Ab</sup>
	325	50±36 <sup>Aa</sup>	4 <sup>Aa</sup>	51±30 <sup>Aa</sup>
	375	45±23 <sup>Aa</sup>	4 <sup>Aa</sup>	49±32 <sup>Aa</sup>
	425	35±17 <sup>Ba</sup>	3 <sup>Aa</sup>	53±30 <sup>Aa</sup>
	475	39±27 <sup>Ba</sup>	3 <sup>Aa</sup>	47±25 <sup>Aa</sup>
	525	37±22 <sup>Ba</sup>	4 <sup>Aa</sup>	45±27 <sup>Aa</sup>
<b>(T2) 60min</b>	275	26±17 <sup>Cc</sup>	4 <sup>Aa</sup>	43±16 <sup>Ab</sup>
	325	43±38 <sup>Aa</sup>	4 <sup>Aa</sup>	56±24 <sup>Aa</sup>
	375	30±25 <sup>Ba</sup>	4 <sup>Aa</sup>	53±30 <sup>Aa</sup>
	425	32±22 <sup>Ba</sup>	4 <sup>Aa</sup>	47±29 <sup>Aa</sup>
	475	32±22 <sup>Ba</sup>	3 <sup>Aa</sup>	42±22 <sup>Aa</sup>
	525	28±17 <sup>Ba</sup>	4 <sup>Aa</sup>	47±26 <sup>Aa</sup>

A, B, C - Valores seguidos de letras maiúsculas indicam diferença estatística entre as diferentes osmolaridades e com o fluido epididimal dentro do mesmo tempo ( $P < 0,05$ ), entre as linhas.

a, b - Valores seguidos de letras minúsculas indicam diferença estatística na mesmas osmolaridades e com o fluido epididimal entre os tempos T0, T1 e T2 ( $P < 0,05$ ).



Tabela 2: Média e desvio padrão dos parâmetros de motilidade, vigor e integridade de membrana plasmática (ITM) dos espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos domésticos no controle (fluido epididimário), nas osmolaridades de 325 e 375 mOsm e durante as etapas de diluição, resfriamento e congelação, com o emprego dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol.

Etapa		Parâmetros Espermáticos		
		%Motilidade	Vigor	%ITM
Fluido Epididimário	-	90±10 <sup>A</sup>	5 <sup>A</sup>	84±10 <sup>A</sup>
Diluição	325	70±10 <sup>AB</sup>	5 <sup>A</sup>	70±14 <sup>A</sup>
	375	67±12 <sup>AB</sup>	5 <sup>A</sup>	70±21 <sup>A</sup>
Resfriamento	325	53±21 <sup>BC</sup>	5 <sup>AB</sup>	56±8 <sup>A</sup>
	375	50±17 <sup>BC</sup>	5 <sup>AB</sup>	62±17 <sup>A</sup>
Congelação	325 GL4%	28±17 <sup>C</sup>	3 <sup>AB</sup>	47±20 <sup>B</sup>
	325 EG 3%	7±2 <sup>D</sup>	2 <sup>BC</sup>	48±7 <sup>A</sup>
	325 EG6%	4±5 <sup>E</sup>	1 <sup>C</sup>	52±14 <sup>A</sup>
	375 GL4%	25±6 <sup>C</sup>	4 <sup>AB</sup>	48±9 <sup>A</sup>
	375 EG 3%	10±8 <sup>F</sup>	2 <sup>BC</sup>	42±11 <sup>B</sup>
	375 EG6%	8±5 <sup>G</sup>	2 <sup>BC</sup>	54±4 <sup>A</sup>

GL4%: Glicerol com diluidor na osmolaridade 325;

375 GL4%: Glicerol com diluidor na osmolaridade 375;

325EG3%: Etilenoglicol à 3% com diluidor na osmolaridade 325;

375EG3%: Etilenoglicol à 3% com diluidor na osmolaridade 375;

325EG6%: Etilenoglicol à 6% com diluidor na osmolaridade 325;

375EG6%: Etilenoglicol à 6% com diluidor na osmolaridade 375.

A,B,C - Valores seguidos de letras maiúsculas diferentes apresentam indicam diferença entre os tratamentos (P< 0,05), entre linhas da mesma coluna.

Tabela 3: Média e desvio padrão das alterações morfológicas dos espermatozoides da cauda do epidídimo de gatos domésticos no controle (fluido epididimário), nas osmolaridades de 325 e 375 mOsmol e durante as etapas de diluição, resfriamento e congelação, com o emprego dos crioprotetores glicerol e etilenoglicol.

Etapas		Morfologia Espermática					
		%MORF N	%CD	%CE	%CI	%G CP	%G CD
Fluido Epididimário	-	66±14 <sup>A</sup>	13±10 <sup>A</sup>	10±17 <sup>A</sup>	11±8 <sup>A</sup>	3±2 <sup>A</sup>	2±1 <sup>A</sup>
Diluição	325	53±12 <sup>A</sup>	29±5 <sup>Aa</sup>	4±3 <sup>Aa</sup>	13±8 <sup>Aa</sup>	1±0 <sup>Aa</sup>	-
	375	54±17 <sup>A</sup>	25±4 <sup>Aa</sup>	1±0 <sup>Aa</sup>	16±18 <sup>Aa</sup>	-	-
Resfriamento	325	47±16 <sup>A</sup>	25±6 <sup>Aa</sup>	5±1 <sup>Aa</sup>	19±14 <sup>Aa</sup>	1±0 <sup>Aa</sup>	2±0 <sup>Aa</sup>
	375	49±19 <sup>A</sup>	31±6 <sup>Aa</sup>	5±1 <sup>Aa</sup>	19±14 <sup>Aa</sup>	-	-
Congelação	325 GL4%	43±11 <sup>A</sup>	41±7 <sup>Aa</sup>	5±2 <sup>Aa</sup>	13±15 <sup>Aa</sup>	-	3±0 <sup>Aa</sup>
	325 EG3%	43±19 <sup>A</sup>	47±28 <sup>Bb</sup>	12±12 <sup>Ab</sup>	13±5 <sup>Ab</sup>	-	-
	325 EG6%	46±14 <sup>A</sup>	28±18 <sup>A</sup>	27±23 <sup>Aa</sup>	5±0 <sup>Bb</sup>	-	-
	375 GL4%	30±19 <sup>A</sup>	41±2 <sup>Bb</sup>	18±9 <sup>Aa</sup>	40±0 <sup>Bc</sup>	-	-
	375 EG3%	43±15 <sup>A</sup>	29±18 <sup>Aa</sup>	18±9 <sup>Aa</sup>	40±0 <sup>Bc</sup>	-	-
	375 EG6%	51±26 <sup>A</sup>	31±21 <sup>Aa</sup>	21±17 <sup>Aa</sup>	8±6 <sup>Ab</sup>	-	-

%MORF N: Morfologia normal espermática %CD: cauda dobrada, %CE: cauda enrolada, %CI: cabeça isolada, %GCP: gota citoplasmática distal e %GCD: gota citoplasmática distal.

325GL4%: Glicerol com diluidor na osmolaridade 325;

375GL4%: Glicerol com diluidor na osmolaridade 375;

325EG3%: Etilenoglicol à 3% com diluidor na osmolaridade 325;

375EG3%: Etilenoglicol à 3% com diluidor na osmolaridade 375;

325EG6%: Etilenoglicol à 6% com diluidor na osmolaridade 325;

375EG6%: Etilenoglicol à 6% com diluidor na osmolaridade 375.

A, B – Apresentam diferença estatística significativa com o controle entre as linhas.

a, b, c - Valores seguidos de letras minúsculas diferentes indicam diferença entre os tratamentos (P< 0,05), entre as linhas.



## Discussão

O presente estudo propôs avaliar o efeito de diferentes osmolaridades em três tempos distintos do diluidor Tris-citrato sobre os parâmetros espermáticos para então proceder com a congelação dos espermatozoides da cauda do epidídimo, dessa forma foram utilizadas as osmolaridades de 325 e 375 mOsm que mantiveram os parâmetros espermáticos entre os tempos analisados.

Dessa forma, os resultados de motilidade após congelação utilizando o glicerol a 4% nas duas osmolaridades ( $28\% \pm 17$  e  $25\% \pm 6$ , respectivamente) foram superiores quando comparados com outros estudos. Tsuitsui et al. (2003) e Macente et al. (2012), encontraram 23,7% e 24%, respectivamente, e com resultados semelhantes ao de (Chatdarong et al., 2009 e Buranaamnuay 2013). Em um estudo com sêmen Leões, utilizando um diluidor a Biladyl<sup>®</sup> e glicerol a 4% e 8%, foi encontrado cerca de 20% de motilidade e sugeriram que ainda são necessários outros estudos para melhorar as taxas de sobrevivência de espermatozoides do ejaculados de Leões (Stander-Breedtet al., 2004). Karjaet al. (2016), também observaram taxas de 20% de motilidade em sêmen de tigres com diluidor a base de gema de ovo e 6% de glicerol. Dessa forma, o estabelecimento de protocolos que aumentem a sobrevida dos espermatozóides em modelos experimentais, podem auxiliar na formação de bancos de germoplasma em felinos ameaçados de extinção.

No presente estudo em relação à integridade de membrana plasmática foram observados resultados de  $47\% \pm 20$  e  $48\% \pm 9$  das duas osmolaridades testadas e com o glicerol a 4%, foram superiores ao encontrado por Kashiwasakiet al. (2005), que obteve valores de 32,2%, com um meio diluente contendo 3% de glicerol e ao de Kunkittiet al. (2016) que obtiveram taxas de 43% com diluidor a base de TRIS e com glicerol a 3%, em espermatozóides epididimários de gatos domésticos. Esta diferença pode ser atribuída ao fato de que no presente trabalho foi utilizado um diluidor com osmolaridade mais adequada aos espermatozóides epididimários, fato que pode ter promovido redução do estresse osmótico, proporcionando assim melhores resultados dos parâmetros espermáticos avaliados. Um estudo por Kunkittiet al. (2017) mostrou que espermatozoides do epidídimo de gatos domésticos são altamente suscetíveis ao estresse osmótico, diminuem a motilidade drasticamente quando exposto às soluções com 75 mOsm e 600 mOsm e tem perda completa de motilidade em osmolaridades maiores que 900 mOsm.

Em relação à morfologia espermática, os resultados encontrados com o diluidor Tris-citrato nas duas osmolaridades em todas as etapas da congelação mostraram percentuais com mais de 43% de espermatozoides normais após a descongelação, quando comparado aos resultados de Tebet et al. (2006), que utilizaram o diluidor Tris-gema-Equex, estes autores mostraram que, após descongelação, 23% dos espermatozoides oriundos da cauda do epidídimo apresentaram-se morfologicamente normais. Demonstraram, mais uma vez, que o diluidor pode ter influenciado positivamente na diminuição das taxas de teratospermia. O diluidor Tris-citrato com osmolaridade mais adequada foi capaz de conservar o potencial osmótico dos espermatozóides epididimários de gatos domésticos, mantendo sua morfologia normal durante o processo de congelação.

É muito importante ressaltar que neste trabalho o ajuste da osmolaridade foi realizado com frutose e que a maior quantidade dessa substância no diluidor pode ter contribuído, fortemente, para a sobrevida dos espermatozoides, demonstrando que além de servir como fonte de energia (Hafez & Hafez, 2004), este açúcar pode apresentar um importante papel crioprotetor durante o processo de congelação. No entanto, ainda são necessários mais estudos que corroborem a importância da osmolaridade do diluidor, bem como a real influência da frutose no contexto da manutenção e criopreservação de espermatozóides epididimários de gatos domésticos.

## Conclusão

O estabelecimento de um meio diluidor com um valor de osmolaridade ideal é de extrema importância para a manutenção e recuperação de espermatozóides epididimários. Com isso, mostrou-se que o diluidor Tris-citrato com as osmolaridades de 325 e 375 mOsm permite a obtenção de espermatozoides com boa qualidade, a manutenção dos parâmetros espermáticos, bem como a manipulação espermática durante uma hora sem alterar sua qualidade. Adicionalmente, o crioprotetor glicerol a 4% acrescido de 20% de gema de ovo na Fração A, na osmolaridade 375 mOsm foi considerado o mais viável para manutenção dos parâmetros espermáticos após congelação de espermatozóides epididimários de gatos domésticos.



## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento, ao grupo do Laboratório de Biotecnologia da Reprodução e Medicina dos Animais da Amazônia (BIOMEDAM), ao Hospital de Pequenos Animais da Universidade Federal do Pará (UFPA) e à Faculdade de Medicina Veterinária da UFPA, pelo amparo logístico.

## Referências

- Andrews CJ, Thomas DG, Yapura J, Potter MA.** Reproductive biology of the 38 extant felid species: a review. *Mammal Review*, v.49, p.16–30, 2018.
- Bhattacharya S.** Cryoprotectants and their usage in cryopreservation process. *Cryopreservation biotechnology in biomedical and biological sciences*. doi:10.5772/intechopen.80477, 2018.
- Blom E.** Ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nord Vet Med*, v.25, p.383-391, 1973.
- Buranaamnuay K.** Sperm-TALP: An alternative extender for retrieving and diluting epididymal sperm in the domestic cat. *Reprod Domest Anim*, v.48, n.6, p.912–917, 2013.
- Cary Ja, Madill S, Farnsworth K, Hayana JT, Duos L, Fahning A.** A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. *Can Vet J*, v.45, p.35–41, 2004.
- Chatdarong K, Thuwanut P, Suksamai P, Patanatriradaj S, and Sangwornrachasup A.** Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.377–380, 2009.
- Emerenciano KDM, Lima GL, Peixoto GCX, Silva MA, Oliveira MGC, DE Paula VV, Silva AR.** Recuperação de espermatozoides epididimários de gatos doméstico (*Felis catus*) utilizando soluções à base de Tris ou água de coco em pó. *Acta Vet Brasílica*, v.7, n.2, p.148-153, 2013.
- Glover T, Watson P.** The effect of buffer osmolality on the survival of cat (*Felis catus*) spermatozoa at 5°C. *Theriogenology*, v.24, p.449-455, 1985.
- Guthrie HD, Liu J, Critser JK.** Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.67, n.6, p.1811-1816, 2002.
- Hafez ESE, Hafez B.** Reprodução animal. 7.ed. São Paulo: Manole. Cap.30, p.441-442, 2004.
- Karja K, Ni Wayan, Mokhamad, F., Mohamad AS, Ligaya ITA, T, Retno S, TriHY, Huaso, MB, Ardyta W, Keni K, Tsukasa T, Zhao N, Masayasu T, Fuminori T, Tatsuya T, Kazuhiro K, Yoko S, Takeshige O.** Characteristics and fertility of sumatran tiger spermatozoa cryopreserved with different sugars. *Cryoletters*, v.37, p.264-271, 2016.
- Kashiwasaki N, Yamaguchi R, Uesugi R, Hishiyama N, Kim M, Nakatsukasa R, Kojima Y, Okuda Y, Hisamatsu S, Inomata T, Shinomura M.** Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *J Reprod Dev*, v.51, p.735-739, 2005.
- Kunkitti P, Axné E, Bergqvist AS, Sjunnesson Y.** In vitro fertilization using frozen-thawed feline epididymal spermatozoa from corpus and cauda regions. *Theriogenology*, v.86, n.6, p.1403–1408, 2016.
- Kunkitti P, Chatdarong K, Suwimonteerabutr J, Nedumpun, T, Johannisson, A, Bergqvist AS, Sjunnesson Y, Axné E.** Osmotic tolerance of feline epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*, v.185, p.148-153, 2017.
- Macente BI, Mansano CFM, Pereira MM, Martins MIM, Gioso MM, Savi PAP, Gutierrez RR.** Congelação de espermatozoides epididimários de gatos utilizando o diluidor botu-crio® após refrigeração por 24 h em contêiner de transporte de sêmen botu-tainer. *Acta Vet Brasílica*, v.6, n.2, p.112-117, 2012.
- Rijsselaere T, Van Soom A.** Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergeneeskd Tijdschr*, v.79, p.467–470, 2010.
- Robaire BT, Hinton BT, Orgebin-crist MC.** The Epididymis. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. 3ed. v.1, New York: Elsevier Academic Press, cap.1, p.3-54, 2006.
- Silva CB, Cajueiro FP, Silva VS, Guerra MP.** Crioprotetores etileno glicol ou acetamida na viabilidade in vitro de espermatozoides congelados de ovinos. *Ciência Rural*, v.42, p.6, 2012.
- Stander-Breidt H, Schwabach LMJ, Greyling JPC, Loskutoff NM.** Effect of different cryodiluents and thawing methods on the post-thaw motility of African Lion (*Panthera leo*) spermatozoa. *S Afr J Anim Sci*, v.34, p.74-76, 2004.
- Tebet JM, Martins MIM, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD.** Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*, v.66, p.1629–





1632, 2006.

**Tsutsui T, Wada M, Anzai M, Hori T.** Artificial insemination with frozen epididymal sperm in cats. *J Vet Med Sci*, v.65, p.397-399, 2003.

**Toyonaga M, Sato Y, Sasaki A, Kaihara A, Tsutsui, T.** Artificial insemination with cryopreserved sperm from feline epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology*, v.76, n.3, p.532-537, 2011.

**Villaverde AI, Fioratti EG, Penitenti M, Ikoma MR, Tsunemi MH, Papa FO, Lopes MD.** Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa. *Theriogenology*, v.80, p.730-737, 2013.

**Wei Si JD, Benson HM, John KC.** Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*, v.53, p.336-348, 2006.

**Zambelli D, Prati F, Cunto M, Iacono E, Merlo B.** Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology*, v.69, p.485-490, 2008.

---

## Capítulo 2

Epididymal tail vitrification as an effective method for feline sperm cryobanking

Silmara Leticia Gonçalves Lima<sup>1,2</sup>; Airton Renan Bastos Soares; Leanne Stalker;

Regiane Rodrigues dos Santos<sup>3</sup>; Sheyla Farhayldes Souza Domingues<sup>1,2,3</sup>

## Epididymal tail vitrification as an effective method for feline sperm cryobanking

Silmara Leticia Gonçalves Lima<sup>1,2</sup>; Airton Renan Bastos Soares<sup>1</sup>; Leanne Stalker<sup>4</sup>; Regiane Rodrigues dos Santos<sup>1,3</sup>; Sheyla Farhaydes Souza Domingues<sup>1,2,3</sup>

E-mail: silmaraleticiagl@gmail.com<sup>1,2</sup>; airtonrsoares@gmail.com<sup>1</sup>;  
stalkerl@uoguelph.ca<sup>4</sup>; regiane.r.dos.santos@gmail.com<sup>1,3</sup>;  
shfarha@gmail.com<sup>1,2,3</sup>.

<sup>1</sup> *Laboratory of Wild Animal Biotechnology and Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pará, Castanhal, Pará, Brazil, CEP 68746-360.*

<sup>2</sup> *Postgraduate Program in Animal Health and Production in the Amazon, Federal Rural University of Amazonia, Belém, Pará, Brazil, CEP 66077-530*

<sup>3</sup> *Postgraduate Program of Animal Reproduction in Amazon, Institute of Veterinary Medicine, Federal University of Pará, Castanhal, Pará, Brazil, CEP 68746-360*

<sup>4</sup> *Department of Biomedical Science, University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada.*

### **Abstract**

The study aimed to describe the viability of tomcat (feline) spermatozoa after epididymal tail vitrification-warming. For this, ten pairs of testis-epididymis complexes were used. The epididymal tails were isolated by ligation using Nylon 3.0 sutures and then distributed into two experimental groups. Solid surface vitrification (SSV) was performed using RPMI + 0.1 M Sucrose (MB) base medium for the two treatments: (T1) MB + Glycerol 40% and (T2) MB + Ethylene Glycol 40%. For warming, the epididymal tails were exposed to room temperature for 30 sec and subsequently washed in three de-vitrification solutions at 37 °C: (W1) RPMI + 0.05 M sucrose; (W2) RPMI + 0.025 M sucrose and (W3) RPMI; for 3, 5 and 7 min. Ethylene glycol treatment had

better results for all sperm motility parameters (Motility, Vigor, CASA) compared to glycerol ( $P < 0.05$ ). There were no statistical differences in t viability and acrosome integrity (Trypan-Blue and Giemsa) parameters, plasma membrane integrity (fluorescent dyes Hoechst and PI) or overall health of morphologically normal sperm before and after vitrification among experimental groups. In conclusion, epididymal tail vitrification might be suitable for long term storage of cat sperm.

**Key-words:** Feline; Vitrification; Spermatozoa; Epididymis; CASA.

## **1. Introduction**

Germplasm cryobanking is of great importance to the preservation of biological material from endangered wild species (Swanson, 2006; Santos et al., 2010). In order to develop techniques for the preservation of somatic and gamete cells from wild animal species, domestic animals are still the best models. The domestic cat is an important model for wild felids (Kunkitti et al., 2017), both due to phylogenetic proximity (Swanson et al., 2017) and feasibility since somatic and gamete cells can be easily obtained during routine surgeries (Prochowska et al., 2015; Vizquete et al., 2014; Swanson et al., 2017).

The techniques for obtaining feline epididymal sperm are slicing (Filliers et al., 2008; Vizquete et al., 2014), compression (Luvoni, 2006; Martins et al., 2009; Macente et al., 2018) and flushing (Bogliolo et al., 2001; Siemieniuch; Dubiel, 2007) of the epididymis caudal portion. For these methods, buffer solutions for epididymal fluid expansion and sperm release are used (Vizquete et al., 2014; Prochowska et al., 2015; Lima et al., 2016). However, such procedures may result in a decreased concentration of natural antioxidants

(Sringnam et al., 2011; Macente et al., 2018; Martin-Hidalgo et al., 2019) and removal of plasma membrane proteins (Sullivan et al., 2007; Zhou et al., 2018), affecting sperm-zona pellucida recognition and interaction, acrosome reaction and fertilization (Sullivan and Saez, 2013). To avoid this, the maintenance of sperm cells in the epididymal tail lumen during the cryopreservation process may present as an option (Chatdarong et al., 2009; Toyonaga et al., 2010; Ringleb et al., 2011).

Epididymal cells are capable of maintaining basal sperm metabolism, preventing early activation and maintaining sperm viability (Kedam et al., 2016; Souza et al., 2017) for future fertilization (Tsutsui et al., 2003). Therefore, we hypothesize that vitrifying the entire tail of the cat's epididymis will efficiently protect the sperm cells during the cryopreservation process. This is based on the theory that the epididymis wall and its intraluminal content will act as a protective barrier between sperm and intracellular cryoprotectants, as well as maintain the spermatozoa in an epididymal environment, without the requirement for additional physical manipulation throughout the procedure.

Cryostorage of sperm in liquid nitrogen can be attained by conventional freezing, which employs low concentrations of cryoprotectant and slow controlled cooling in programmable freezers (Karthikeyan et al., 2019), or by vitrification (Swanson et al., 2017), of which there are two types: equilibrium and kinetic. Equilibrium vitrification is widely used in whole organs, tissues, embryos and oocytes, and requires high concentrations of intracellular cryoprotectant agents (CPA) in vitrification solutions to achieve vitreous status (Fahy and Rall, 2007). This methodology has been shown to be unsuitable for

sperm cells, because it leads to osmotic imbalance (Isachenko et al., 2003a), mutagenesis and cell death (Petrunkina, 2007). For these reasons, free intracellular CPA kinetic vitrification has been applied specifically to sperm. This can be achieved due to sperm cell size and its relatively high soluble cytoplasmic macromolecule concentrations (Isachenko et al., 2003a; Sanchez et al., 2012; Slabbert et al., 2014).

Glycerol is the most frequently used permeable CPA for domestic cat sperm cryopreservation (Chatdarong et al., 2009; Villaverde et al., 2013; Jimenez et al., 2013). However, ethylene glycol shows better results than glycerol as a cryoprotectant agent, probably because glycerol is more prone to fracture during the warming process than ethylene glycol (Ally and Shelton, 2007).

The purpose of this study was to determine the effect of equilibrium vitrification of epididymal cauda, comparing two permeable cryoprotectant agents, glycerol and ethylene glycol, on epididymal sperm velocity parameters, membrane and acrosomal integrity and sperm morphology post vitrification as a measurement of overall sperm health .

## **2. Material and Methods**

This study was approved by the Ethical Committee in Animal Research (n° 1650060516 / CEUA/UFPA). The use of the removed epididymis and animal handling procedures during the surgical procedure were allowed by the owners of the animals.

### *2.1. Animals*

Ten (n = 10) mixed breed cats, from 1 year to 3 years old, weighing

between 2.5 and 4.0 kg, were subjected to routine castration at the Veterinary Hospital of the Federal University of Pará. None of the animals presented with any known reproductive pathologies.

### *2.2. Epididymis tail manipulation*

The testis-epididymis complexes were transferred to a petri dish and washed with saline solution (0.9 % NaCl, 20 °C) to remove traces of blood. The parietal vaginal tunic covering the testis-epididymis complex was sectioned with a scalpel blade for visualization of the epididymal tail. Two simple suture ligatures (Nylon 3.0, TECHNOFIO®, Goiás, Brazil) were performed using a needle holder (Mayo Hegar, 15 cm); the first between the body and tail of the epididymis and the second between the tail of the epididymis and vas deferens to avoid both epididymal fluid overflow as well as spermatozoa contact with the vitrification solutions. The vaginal tunic was then sectioned for the whole separation of the epididymis tail from the testis. Epididymal tails were then punctured with a syringe (1 mL) coupled to a 27.5 gauge needle (13 mL x 0.38 mm) to obtain fresh epididymal fluid samples and to perform sperm analysis before vitrification for the control group.

### *2.3. Chemicals*

Unless stated otherwise, chemicals and media used in this study were purchased from Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

### *2.4. Vitrification and warming*

Vitrification was performed using RPMI as a base medium (MB) (0.2 g

RPMI + 0.04 g Sodium Bicarbonate + 133  $\mu$ L HCl + 20 mL ultra-pure water) + 0.1 M Sucrose (SUC) for Ethylene Glycol 40 % (EG) (ISOFAR, Rio de Janeiro, Brazil) or 40 % Glycerol (GL) treatments. The vitrification treatments followed a two-step method where the first exposure was performed for 3 min at 20 °C in equilibrium solution (ES) and the second exposure was performed for 2 min at 20 °C in vitrification solution (VS- EG/ES depending on treatment) (Table 1).

The vitrification technique used was solid surface (SSV), as described by Santos et al. (2007). The epididymal tails were placed on a cold surface consisting of a hollow cube of aluminum foil partially immersed in liquid nitrogen. The vitrified epididymal tails were transferred into cryovials, using liquid nitrogen-cooled forceps, and stored in the liquid phase of a liquid nitrogen tank. Vitrified epididymal tails were stored for one week in liquid nitrogen (- 196 °C). For warming, cryovials were exposed to room temperature (~ 25 °C) for 30 s and fragments were separately submitted to cryoprotectant removal, followed by immersion in a water bath (37 °C) for 30 s. After warming, the intracellular cryoprotectants were removed by three-step washing solutions in a water bath (37 °C). For this, epididymal tails were immersed in three devitrification solutions containing decreasing sucrose (SUC) concentrations, as follows: (W1) RPMI + SUC (0.05 M) (3 min), (W2) RPMI + SUC (0.025 M) (5 min), and (W3) RPMI (7 min).

After vitrification and warming of the epididymal cauda, spermatozoa were rescued by a slicing technique, which consists of cutting the cauda epididymal caudas in 1 mL pre-warmed RPMI (37 °C) with a scalpel blade (n<sup>o</sup> 23) on a petri dish. The epididymal fluid diluted with RPMI were recovered and



transferred to 1 mL microtube for spermatozoa analysis.

### *2.5. Sperm evaluation*

Motility, vigor, morphology, and both plasma and acrosomal membrane integrity (trypan blue staining associated with Giemsa) evaluations of sperm were performed on fresh samples (control group) and experimental groups (EG and GL).

The sperm concentration was determined only after epididymal cauda devitrification and sperm recovery. Post-vitrification sperm parameters were examined comparing the efficacy of cryoprotectants using conjugated fluorescent dyes Hoechst 33342 in association with propidium iodide, and computer-assisted sperm analysis systems (Sperm Class Analyzer SCA®, version 4.0, Microptic S.L., Barcelona, Spain).

Motility and vigor were subjectively evaluated by optical microscope (Leica E400, Nikon, Tokyo, Japan). A heated (37 °C) coverslip was prepared with 5 µL of extended epididymal fluid in RPMI. The motility was reported as the percentage of motile sperm, and vigor was evaluated on a scale of 0 to 5. Sperm vigor was subjectively evaluated on a scale of 0 to 5. Briefly, no motility was considered 0, slight movement with greater than 75% of sperm showing vibration only was represented by 1, moderate forward movement in about greater than 50% of sperm was represented by 2, forward movement in about 70% of sperm was represented by 3, and when 90% or greater than 95% of sperm presented very active forward movement, scales 4 and 5 were used (Villaverde et al., 2006).

Plasma and acrosomal membrane integrity were assessed by trypan

blue staining associated with Giemsa (Didion et al. 1989). Two hundred cells were counted on an optical microscope at 100x magnification. The sperm were classified into four categories: Live sperm with intact acrosome (LIA) – pink stained acrosome by Giemsa and white post-acrosomal region; Dead sperm with intact acrosome (DIA) – pink stained acrosome and dark blue stained post-acrosomal region by trypan blue; Live sperm with detached acrosome (TAR) – white acrosome and white post-acrosome region; Dead sperm with detached acrosome (FAR) – white acrosome and dark blue stained post-acrosomal region.

Sperm morphology was evaluated by a smear prepared by adding 5  $\mu$ L eosin 1% (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) and 5  $\mu$ L nigrosin 1% (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil) to 5  $\mu$ L sperm suspension on a pre-warmed (37 °C) glass slide. Morphologic defects detected in the spermatozoa were classified as primary or secondary. Total sperm concentration was calculated using a Neubauer chamber (Hirschmann EM techcolor, Eberstadt, Germany), after diluting the 1  $\mu$ L of sperm mass in 99  $\mu$ L of saline formaldehyde (10 %).

To assess the sperm plasma membrane integrity, conjugated fluorescent dyes Hoechst 33342 (Molecular Probes, Oregon, USA) associated with propidium iodide (500  $\mu$ g / ml; P-4170; Sigma Chemical Co.) were used in accordance with the protocol described by Celeghini et al. (2007). An aliquot of sperm (50  $\mu$ l) was added to 3  $\mu$ l H3342 (40  $\mu$ g / mL DPBS) and 3  $\mu$ L of propidium iodide (2 mg / mL DPBS) and incubated in the dark for 8 min at room temperature (37 °C). After incubation, a 5  $\mu$ l drop was placed on a coverslip slide and evaluated using a fluorescence phase-contrast microscope (Model

Eclipse Ni, Nikon, Tokyo, Japan). A count of 200 sperm cells at 100x magnification under immersion was performed, and the proportion of live/dead sperm cells was determined.

For computer analysis, 10µl of the epididymal fluid extended was evaluated in a phase contrast microscope connected to a video camera adapted to the computer-system analysis (CASA). The following spermiatic parameters were analyzed: percentage of mobile cells (MOT), percentage of mobile progressive cells (PMOT), fast speed sperm, medium speed sperm, slow speed sperm, path speed (VCL), average path speed (VAP), progressive speed (VSL), progressive displacement (VSL), lateral head displacement (ALH), straightness (STR) and linearity (LIN), wobble coefficient (WOOB), Beating frequency (BFC).

### *2.6. Statistical analysis*

All data are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (SD) and analyzed by the StatView 5.0 program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA), except vigor, which was expressed as mode. The effect of vitrification in sperm motility, vigor, plasma membrane integrity and morphology were compared using the Kruskal–Wallis test (Statview 5.0, SAS Institute Inc., Cary, NY, USA).  $P < 0.05$  was considered as statistically significant.

## **3. Results**

The average sperm concentration after vitrification, warming and recovery of spermatozoa from epididymal caudae was  $10.6 \times 10^6 \pm 9.1$  spz /

mL ( $n = 10$ ), with no statistical differences observed between treatments. The use of RPMI (1 mL, 37 °C) was suitable for spermatozoa recovery and warming.

The epididymal sperm motility, plasma and acrosomal membrane integrity at pre and post vitrification is shown in Figure 1. Vitrification with EG ( $P = 0.029$ ) and GL ( $P = 0.0001$ ) cryoprotectants affected motility compared to sperm from fresh epididymal fluid ( $82.0 \pm 8.3$ ) (Fig. 1). However, ethylene glycol treatment resulted in better sperm motility parameters compared to glycerol ( $68.0 \pm 8,3$  versus  $19.0 \pm 2,2$ ,  $P = 0.0001$ ). Plasma and acrosomal membrane integrity evaluated by Trypan Blue - GYMSA (Fig. 2C) (Fig. 1) as well as sperm morphology (Table 2) were not affected by vitrification, regardless of treatment. Additionally, the modes of vigor for the control, EG and GL groups, were 5, 5 and 3, respectively. The ethylene glycol treated sperm had similar vigor evaluation when compared to control ( $P = 0.34$ ).

The results of live/dead fluorescence of sperm cells (Fig. 2A and B) and CASA analysis are summarized in Table 3. The mean of live/dead sperm cells, motility and velocity CASA parameters (MOT, PMOT, SPEED, VCL, VAP and VSL) were better for the ethylene glycol group when compared with glycerol ( $P < 0.05$ ) post warming.

#### **4. Discussion**

To the best of our knowledge, this study is the first report to perform and evaluate equilibrium vitrification of the whole epididymal tail and to recover and manipulate sperm only after de-vitrification in the domestic feline. Ethylene

glycol and glycerol were both evaluated as potential cryoprotectants within this methodology.

The conventional recovery and cryopreservation of epididymal sperm immediately after animal death or castration requires trained staff, specific media and equipment, designated space and time to recover and freeze the epididymal spermatozoa (Kashiwazaki et al., 2005; Tebet et al., 2006; Prochowska et al., 2016). Due to these requirements, maintaining epididymis at controlled temperatures for transport to specialized laboratories has been considered in previous studies. However, the effect of keeping the epididymis at temperatures ranging from 4 – 5 °C for 12 (Hay and Goodrowe, 1993), 24h (Ganan et al., 2009; Toyonaga et al., 2010, 2011b) or 4 days (Chatdarong et al., 2009) showed negative impacts on motility, viability and normal morphology of epididymal sperm before freezing and consequently post-thaw. Epididymal tail vitrification however, which can be performed in field conditions, showed promising results, with both high sperm motility and high sperm vigor rates, as well as maintained plasma and acrosomal membrane integrity compared to control in both treatment groups evaluated post-vitrification and warming.

Sperm cells are extremely sensitive to oxidative stress as well as osmotic, pH and luminal epididymal protein changes (Sullivan and Saez, 2013; Zhou et al., 2018). In an attempt to provide additional protection for the sperm cells during the vitrification process, the structure and intraluminal environment of the epididymis tail were maintained as much as possible.

Epididymal epithelial cells are responsible for the creation of the highly specialized luminal microenvironment. Analysis of the composition of

epididymal luminal fluids reveals a complex and wide variety of ions, non-coding microRNAs, soluble proteins, non-pathological amyloid matrix, and exosome vesicles called epididymosomes, which are important in the process of sperm storage (Zhou et al., 2018) and maturation (Rowlison et al., 2018).

Studies on epididymal sperm cryopreservation in tomcat, usually first performs the spermatozoa retrieval from epididymal microenvironment, using techniques that structurally disrupt the epididymis (Luvoni, 2006; Martins et al., 2009; Vizquete et al., 2014; Prochowska et al., 2016). These approaches also use extenders (Bogliolo et al., 2001; Siemieniuch; Dubiel, 2007; Buranaamnuay, 2015; Prochowska et al., 2016) that alter the ionic and protein composition of the epididymal fluid. These extenders were developed for total semen, and it is not taken into account that the epididymal microenvironment presents a different composition from the seminal fluid (Jiménez et al., 2013).

The two protocols employed for the epididymal cauda vitrification in this study were efficient to preserve both plasma membrane and acrosome integrity. The post-thaw acrosome integrity has been reported to diminish in comparison with fresh samples (Tebet et al., 2006) in conventional freezing, since with the supplementation of Equex STM paste (Axnér et al., 2004). The role of the epididymal environment in protecting acrosomal integrity has not been clarified in cat, but the importance of epididymosomes in maintaining higher and sustained motility of immature sperm cells throughout 3 h of incubation has been reported (Rowlison et al., 2018), which may corroborate with the importance of keeping the epididymal environment intact for cryopreservation.

Kinetic vitrification of spermatozoa obtained from ejaculates is already successful in humans (Isachenko et al., 2004; Isachenko et al., 2012a, b). These protocols do not use permeable cryoprotectants agents (PCAs), because they are unsuitable for sperm cells due to their lethal osmotic and cytotoxic effects (Isachenko et al., 2003a, b). The reproductive potential of vitrified human sperm in the absence of PCAs had been proven by obtaining healthy live births after both intracytoplasmic sperm injection (ICSI) (Isachenko et al., 2012a) and uterine insemination (Sanchez et al., 2012).

Recently, domestic cat sperm obtained from urethral catheterization have shown equal *in vitro* fertilization capacity after kinetic vitrification when compared to slow freezing even with the negative effect of the two cryopreservation techniques on sperm parameters (Swanson et al., 2017).

For epididymal sperm, vitrification techniques are still under development and have been described in cat (Vizueté et al., 2014), mice (Horta et al., 2017), Ibex (*Capra pyrenaica*) (Pradié et al., 2018), stallion (Alvarez et al., 2019) and human (Spis et al., 2019). In all studies, sperm were removed from the epididymis prior to the vitrification process, and media containing only extracellular cryoprotectants were used. The vitrification techniques employed had a negative effect on all sperm parameters, however successful birth after ICSI in humans (Spis et al., 2019), as well as successful IVF in mice (Horta et al., 2017) and heterologous (Pradié et al., 2018) and homologous (Pradié et al., 2018) *in vitro* fertilization in Ibex have been attained.

These previous studies confirmed the potential for long term storage of epididymal spermatozoa for *in vitro* embryo production. However, in these

studies, just a small sample of spermatozoa from epididymal cauda were recovered and there were a lot of steps for spermatozoa processing before and after vitrification. The cryopreservation of whole epididymal caudae might result in increased maintenance of spermatozoa quantity without the necessity of complex procedures for sperm processing, resulting in sperm which may be more suitable for downstream utilization in other assisted reproductive technologies.

In the present study, even with the use of highly permeable cryoprotectant concentrations, as in protocols used for ovarian tissue (Brito et al., 2018) and testicular tissue (Lima et al., 2018), epididymis tail vitrification enabled the recovery of viable sperm cells after heating at similar rates when compared to the control group (fresh sample). Thus, it is possible that the tail wall of the epididymis prevents direct contact of the sperm with the highly permeable cryoprotectant concentrations, and acts to maintain the epididymal fluid, which is beneficial to the sperm cell.

According to Isachenko et al. (2003b), the sperm cell can be successfully vitrified in the absence of intracellular cryoprotectants, because it is a small cell with high compartmentalization and has a high concentration of endogenous natural vitrificants such as polymers, sugars and nucleotides in relation to the small amount of water, which is responsible for its high intracellular viscosity.

Other advantages of vitrification of complete epididymal caudae is the possibility to avoid the direct contact of spermatid cells with liquid nitrogen during freezing. Despite methods used for cryopreservation or devices used to plug the samples in liquid nitrogen, the epididymal wall and its environment may



provide an additional layer of protection for the spermatozoa. The possibility of liquid nitrogen contamination by pathogens is subject of concern among cryobiologists (Isachenko et al., 2017) and there is no supplier of sterile liquid nitrogen suitable for assisted reproductive technologies, therefore an ability to avoid any direct contact should be considered beneficial.

An advantage of epididymal sperm vitrification over ovarian and testicular tissues, is that the gametes recovered from these tissues are not yet mature and ready for fertilization, whereas epididymal sperm are almost completed prepared for use in assisted reproduction techniques immediately post recovery (Zhou et al., 2018).

In the present study we used a combination of one permeating and one non-permeating cryoprotectant. The two vitrification solutions were tested before the experiments to determine they were able to achieve the vitreous state. However, the best results for sperm quality were obtained with ethylene glycol. This may be due to the ability of ethylene glycol to vitrify more efficiently and in a more stable way when compared to glycerol (Ally and Shelton, 2007).

Epididymis tail vitrification is a simple and less expensive procedure when compared to slow freezing. It does not require a highly specialized laboratory for its execution and can be done under field conditions. Thus, the epididymis tail vitrification of felines found dead or obtained through orchiectomies can be easily stored, and aid to safeguard irreplaceable genetic material for conservation in germplasm banks, as well as contribute to the possibility of returning endangered feline specimens to their natural environment, after the downstream use of assisted reproduction techniques.

## **5. Conclusion**

The results presented here show the potential of equilibrium vitrification of the whole epididymis cauda with RPMI in association with 40 % ethylene glycol plus sucrose (0.1 M) in domestic felines. The protocol results in preserved sperm motility, vigor and plasmatic / acrosomal membrane integrities.

## **6. Acknowledgements**

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Cnpq- Brazil. The authors thank the Universidade Federal do Pará.

## **7. Author Contribution Statement**

1. Conceptualization: Lima, S. L. G., Santos, R. R. & Domingues, S. F. S.
2. Experimentation and analysis: Lima, S. L., Soares, A. R. B. & Domingues, S. F. S.
3. Funding acquisition: Santos, R. R. & Domingues, S. F. S.
4. Writing – original draft: Lima, S. L., Soares, A. R. B., Santos, R. R., Domingues, S. F. S. & Stalker, L.
5. Writing – review & editing: Domingues, S. F. S., Stalker, L. & Santos, R. R.

## **8. Competing interests statement**

There is no conflict of interest.

## **9. References**

Ally, J., Shelton, J., 2007. Development of vitrification solutions. In: Vitrification in Assisted Reproduction: A User's Manual and Troubleshooting Guide. Eds: M. J. Tucker and J. Liebermann. London, UK, Informa Healthcare. 45-63.

Álvarez, C., González, N., Luño, V., Gil, L., 2019. Ejaculated compared with epididymal stallion sperm vitrification. *Anim. Reprod. Sci.* 211, 106-205. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2019.106205>

Axnér, E., Hermansson, U., Linde-Forsberg, C., 2005. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 84, 179–191. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2003.11.003>

Bogliolo, L., Leoni, G., Ledda, S., Naitana, S., Zedda, M., Carluccio, A., Pau, S., 2001. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 56, 955–967. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00621-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00621-5)

Brito, D.C.C., Domingues, S.F.S., Rodrigues, A.P R., Maside, C., Lunardi, F.O., Wu, X., Figueiredo, J.R., Pieczarka, J.C., Santos, R.R., 2018. Cryopreservation of domestic cat (*Felis catus*) ovarian tissue: Comparison of two vitrification methods. *Theriogenology* 111, 69-77. [https://doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.01.015](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.015)

Buranaamnuay, K., 2015. Determination of appropriate cryopreservation protocols for epididymal cat spermatozoa. *Reprod. Domestic. Anim.* 50, 378–385. <https://doi.org/10.1111/rda.12496>

Didion, B.A., Dobrinsky, J.R., Giles, J.R., Graves, C.N., 1989. Staining procedure to detect viability and the true acrosome reaction in spermatozoa of

various species. *Gamete Research* 22, 51–57. <https://doi:10.1002/mrd.1120220106>

Fahy, G.M., Rall, W.F., 2007. Vitrification: an overview. In: *Vitrification in Assisted Reproduction: A User's Manual and Troubleshooting Guide*. Eds: M. J. Tucker and J. Liebermann. London, UK, Informa Healthcare, 1-20.

Filliers, M., Rijsselaere, T., Bossaert, P., Causmaecker, V., Dewulf, J., Pope, C.E., Van Soom, A., 2008. Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (48C) on sperm quality. *Theriogenology* 70. 1550–1559. [doi:10.1016/j.theriogenology.2008.07.004](https://doi:10.1016/j.theriogenology.2008.07.004)

Horta, F., Alzobi, H., Jitanantawittaya, S., Catt, S., Chen, P., Pangestu, M., Temple-Smith, P., 2017. Minimal volume vitrification of epididymal spermatozoa results in successful in vitro fertilization and embryo development in mice. *Asian J. Androl.* 19, 107–112. [https://doi: 10.4103/1008-682X.183378](https://doi:10.4103/1008-682X.183378)

Isachenko, V., Isachenko, E., Petrunkina, A.M., Sanchez, R., 2012a. Human spermatozoa vitrified in the absence of permeable cryoprotectants: Birth of two healthy babies. *Reprod. Fertil. Dev.* 24, 323-6. [https://doi: 10.1071/RD11061](https://doi:10.1071/RD11061)

Isachenko, V., Maettner, R., Petrunkina, A.M., Sterzik, K., Mallmann, P., Rahimi, G., Sanchez, R., Risopatron, J., Damjanoski, I., Isachenko, E.J., 2012b. Vitrification of human ICSI/IVF spermatozoa without cryoprotectants: new capillary technology. *Androl.* 33, 462-8. [https://doi: 10.2164/jandrol.111.013789](https://doi:10.2164/jandrol.111.013789)

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Nawroth, F., 2003a. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants: review of problem and practical

success. *Reprod. Biomed. Online* 6, 191–200. [https://doi:10.1016/s1472-6483\(10\)61710-5](https://doi:10.1016/s1472-6483(10)61710-5)

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, S., Nawroth, F., 2003b. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine* 6, 191-200. [https://doi: 10.1016/s1472-6483\(10\)61710-5](https://doi:10.1016/s1472-6483(10)61710-5)

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Rahimi, G., Schondorf, T., Mallmann, P., Dessole, S., Nawroth, F., 2004. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum. Reprod.* 19, 932-9. [https://doi: 10.1093/humrep/deh194](https://doi:10.1093/humrep/deh194)

Jiménez, E., Pérez-Marín, C.C., Vizuite, G., Millán, Y., Aguera, E.I., 2013. Effect of Different Extenders on In Vitro Characteristics of Feline Epididymal Sperm During Cryopreservation. *Reprod. Dom. Anim.* 48, 665–672 ; [https://doi: 10.1111/rda.12142](https://doi:10.1111/rda.12142)

Johnson, J.D., Bateman, H.L., Newsom, J., Vansandt, L.M., Swanson, W.F., 2015. Semen vitrification in felids – a simplified cryopreservation method for field use. *Proceedings of the Annual Conference American Association of Zoo Veterinarians*, 124–125. <https://doi:10.1111rda.12863>

Karthikeyan, M., Arakkal, D., Mangalaraj, A.M., Kamath, M.S., 2019. Comparison of conventional slow freeze versus permeable cryoprotectant-free vitrification of abnormal semen sample: A randomized controlled trial. *J. Hum. Reprod. Sci.* 12, 150-5. [https://doi:10.4103/jhrs.JHRS\\_154\\_18](https://doi:10.4103/jhrs.JHRS_154_18)

Kedam, T., Katepogu, K., Beeram, E., 2016. Effect of Cryopreservation on Rat Epididymis - A Histological Analysis. *Journal of Biomedical Sciences* 5, 2:11. <https://doi:10.4172/2254-609X.100025>

Kashiwazaki, N., Yamaguchi, R., Uesugi, R., Hishiyama, N., Kim, M., Nakatsukasa, E., Kojima, Y., Okuda, Y., Hisamatsu, S., Inomata, T., Shino, M., 2005. Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *J. Reprod. Dev.* 51(6), 735-739. <https://doi.org/10.1262/jrd.17052>

Kunkitti, P., Chatdarong, K., Suwimonteerabutr, J., Nedumpun, T., Johannisson, A.; Bergqvist, A.S., Sjunnesson, Y., Axnér, E., 2017. Osmotic tolerance of feline epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* Oct; v.185. p.148-153. <https://doi:10.1016/j.anireprosci.2017.08.014>

Lima, D.B.C., Silva, T.F.P., Aquino-Cortez, A., Leiva-Revilla, J., Silva, L.D.M., 2018. Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. *Theriogenology* 110, 110-115. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2017.12.037>

Lima, D.B.C., Silva, T.F.P., Aquino-Cortez, A., Pinto, J.N., Magalhães, F.F., Caldini, B.N., Silva, L.D.M., 2016. Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and tris extenders. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 68, 873-881. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8653>

Luvoni, G.C., 2006. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66, 101-11. <http://doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.012>

Macente, B.I., Gutierrez, R.R., Aparício, M., Balieiro, C.C., Mansano, C.F.M., Pereira, M.M., Borges-Silva, J.C., Pires-Buttler, E.A., Galvão, A.L.B., Toniollo,

G.H., Luvoni, G.C., Morselli, M.G., Vicente, W.R.P., 2018. Cat epididymal semen cryopreserved with and without vitamin E: effect on sperm parameters and lipid peroxidation. *Anim. Reprod.* 15, 1193-1198. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR2018-0001>

Martin-Hidalgo, D., Bragado, M.J., Batista, A.R. Pedro, F., Oliveira, P.F., Alves, M.G., 2019. Antioxidants and Male Fertility: From Molecular Studies to Clinical Evidence. *Antioxidants (Basel)* 8, 89. <http://doi: 10.3390/antiox8040089>

Martins, J.L., Villaverde, A.I., Lima, A.F., Steagall, P.V., Ferreira, J.C., Taconeli, C.A., Lopes, M.D., 2009. Impact of 24-h cooling prior to freezing on the survival of domestic cat (*Felis catus*) epididymal sperm. *Cat epididymal semen cryopreserved with and without vitamin E: effect on sperm parameters and lipid peroxidation. Reprod. Domestic. Anim.* 44, 366–368. <http://doi: 10.1111/j.1439-0531.2009.01432.x>

Petrunkina, A., 2007. Fundamental aspect of gamete cryobiology. *J. Reprod. Med. Endocrinol.* 4, 78–91. <https://www.researchgate.net/publication/277237824>.

Pradieé, J., Sánchez-Calabuig, M.J., Castaño, C., O'Brien, E., Estesó, M.C., Beltran-Brenã, P., Maillo, V., Santiago-Moreno, J., Rizos, D., 2018. Fertilizing capacity of vitrified epididymal sperm from Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *Theriogenology* 108, 314-320. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.11.021>

Prochowska, S., Nizánski, W., Ochota, M., Partyka, A., 2015. Characteristics of urethral and epididymal semen collected from domestic cats - a retrospective

study of 214 cases. *Theriogenology* 84, 1565-1571. [https://doi:10.1016/j.theriogenology](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology)

Prochowska, S., Niżański, W., Partyka, A., 2016. Comparative analysis of in vitro characteristics of fresh and frozen-thawed urethral and epididymal spermatozoa from cats (*Felis domesticus*). *Theriogenology* 86, 2063-2072. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.07.002>

Ringleb, J., Waurich, R., Wibbelt, G., Streich W.J., Jewgenow, K., 2011. Prolonged storage of epididymal spermatozoa does not affect their capacity to fertilise in vitro-matured domestic cat (*Felis catus*) oocytes when using ICSI. *J. Reproduction, Fertility and Development* 23, 818–825. <https://doi.org/10.1071/RD10192>

Rowlison, T., Ottinger, M.E., Comizzoli, P., 2018. Key factors enhancing sperm fertilizing ability are transferred from the epididymis to the spermatozoa via epididymosomes in the domestic cat model. *J. Assist. Reprod. Genet.* 35, 221–228. <https://doi.org/10.1007/s10815-017-1083-3>

Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J.V., Isachenko, V., Isachenko, E., 2012. Vitrified sperm banks: the new aseptic technique for human spermatozoa allows cryopreservation at  $-86^{\circ}\text{C}$ . *Andrologia* 44(6), 433–435. <https://doi:10.1111/j.1439-0272.2012.01314.x>

Santos, R., Tharasanit, T., Van Haeften, T., Figueiredo, J., Silva, J., Van den Hurk, R., 2007. Vitrification of goat preantral follicles enclosed in ovarian tissue by using conventional and solid-surface vitrification methods. *Cell Tissue Res.* 327, 167-76. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2018.01.015>



Santos, R.R., Amorim, C., Cecconi, S., Fassbender, M., Imhoff, M., Lornage, J., Paris, M., Schoenfeldt, V., Martinez-Madrid, B., 2010. Cryopreservation of ovarian tissue: An emerging technology for female germline preservation of endangered species and breed. *An. Reprod. Sci.* 122, 151-163. doi:10.1016/j.anireprosci.2010.08.010

Siemieniuch, M., Dubiel, A., 2007. Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 135–144. <http://doi:10.1016/j.anireprosci.2006.04.049>

Slabbert, M., Plessis, S.S., Du, Huysen, C., 2014. Large volume cryoprotectant-free vitrification: an alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia* 47, 594-9. <http://doi:10.1111/and.12307>

Souza, A.P.B., Schorr-Lenz, A.M., Lucca, F., Bustamante-Filho, I.C., 2017. The epididymis and its role on sperm quality and male fertility. *Anim. Reprod.* 14, 1234-1244. <https://doi:10.21451/1984-3143-AR955>

Spis, E., Bushkovskaia, A., Isachenko, E., Todorov, P., Sanchez, R., Skopets, V., Isachenko, V., 2019. Conventional freezing vs. cryoprotectant-free vitrification of epididymal (MESA) and testicular (TESE) spermatozoa: Three live births. *Cryobiology* 90, 100-102. <http://doi:10.1016/j.cryobiol.2019.08.003>

Sullivan R., Saez, F., 2013. Epididymosomes, prostasomes, and liposomes: their roles in mammalian male reproductive physiology. *Reproduction* 146, 21-35. <http://doi:10.1530/REP-13-0058>

Sullivan, R., Frenette, G., Girouard, J., 2007. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J. Androl.* 9, 483-491. <http://doi:10.1111/j.1745-7262.2007.00281.x>

Sringnam, S., Kitlynant, Y., Lewin, L.M., Saikhun, K., 2011. Semen quality and chromatin condensation in domestic cat sperm during passage through the epididymis. *Kasetsart J. Nat. Sci.* 45, 46-58.

Swanson, W.F., 2006. Application of assisted reproduction for population management in felids: The potential and reality for conservation of small cats. *Theriogenology* 66, 49–58. <http://doi:10.1016/j.theriogenology.2006.03.024>

Swanson, W., Bateman, H., Vansandt, L., 2017. Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reprod. Domest. Anim.* 52, 255-260. <https://doi.org/10.1111/rda.12863>

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.* 72(6), 777–780. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0260>

Tsutsui, T., Wada, M., Anzai, M., Hori, T., 2003. Artificial Insemination with frozen epididymal sperm in cats. *Journal of Veterinary Medicine Science* 65, 397- 399. <https://doi: 10.1292/jvms.65.397>

Villaverde, À.I.S.B., Mello-Martins, M.I., Basto-Castro, V., Lopes, M.D. 2006. Morphological and functional characteristics of chilled semen obtained from domestic feline epididymides (*Felis catus*). *Theriogenology*; 66:1641–4. <https://doi:10.1016/j.theriogenology.2006.02.011>

Vizuete, G., Jiménez, E., Aguera, E.I., Pérez-Marin, C.C., 2014. Impact of ultra-rapid freezing on the motility, morphology, viability and acrosome integrity of epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders. *Reprod. Domest. Anim.* 49, 5-8. <https://doi: 10.1111/rda.12253>

Zhou, W., De Iuliis, G.N., Dun, M.D., Nixon, B., 2018. Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Frontiers in Endocrinology* 9, 59. <https://doi:10.3389/fendo.2018.00059>

Table 1: Equilibrium (ES) and Vitrification (VS) solutions composition, time and temperature of exposure used to vitrify epididymal tail of cats in solid surface (SSV).

Cryoprotectants		Exposure	
Intracellular	Extracellular	ES (3 min at 20°C)	VS (2 min at 20°C)
Ethylene Glycol (EG)	Sucrose (SUC)	20% EG + 0.1M SUC	40% EG + 0.1 M SUC
Glycerol (GL)		20% GL + 0.1M SUC	40% GL + 0.1 M SUC

Table 2: Mean ( $\pm$  SD) percentages of normal sperm and sperm morphology (with major and minor pathologic defects) of epididymal sperm post vitrification with ethylene glycol (EG) and glycerol (GL). Data from five ( $n = 5$ ) distinct tomcats. There were no differences among treatments ( $P < 0.05$ ).

<b>Morphology</b>	<b>Control</b>	<b>EG</b>	<b>GL</b>
<b>Normal sperm</b>	84.0 $\pm$ 6.7	88.2 $\pm$ 5.4	89.8 $\pm$ 4.0
<b>Bent Tail</b>	2.0 $\pm$ 0.4	5.2 $\pm$ 2.6	0.3 $\pm$ 0.3
<b>Strongly bent tail</b>	0.2 $\pm$ 0.2	0.8 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 4.2
<b>Coiled tail</b>	0.2 $\pm$ 0.2	1.0 $\pm$ 0.7	0.6 $\pm$ 0.5
<b>Strongly coiled tail</b>	1.4 $\pm$ 1.1	1.6 $\pm$ 1.4	1.8 $\pm$ 1.7
<b>Isolated head</b>	7.6 $\pm$ 4.6	2.6 $\pm$ 1.1	3.0 $\pm$ 2.8
<b>Proximal cytoplasmic droplet</b>	1.1 $\pm$ 0.7	0.5 $\pm$ 0.5	0.4 $\pm$ 0.4
<b>Distal cytoplasmic droplet</b>	3.7 $\pm$ 3.5	0.4 $\pm$ 0.4	0.2 $\pm$ 0.2

Table 3: Mean and standard deviation of Intact plasma membrane (Hoechst/Propidium iodine) and motility parameters assessed by CASA after devitrification with ethylene glycol and glycerol. Data from five (n = 5) distinct tomcats.

<b>Parameters</b>	<b>EG</b>	<b>GL</b>	<b><i>P</i> - value</b>
<b>IPM</b>	51.0 ± 7.0 <sup>A</sup>	34.0 ± 8.0 <sup>B</sup>	0.0081
<b>MOT</b>	66.57 ± 10.5 <sup>A</sup>	17.3 ± 2.9 <sup>B</sup>	0.0001
<b>PMOT</b>	36.7 ± 11.7 <sup>A</sup>	4.7 ± 1.5 <sup>B</sup>	0.0003
<b>Speed</b>	31.7 ± 12.8 <sup>A</sup>	3.2 ± 0.9 <sup>B</sup>	0.0011
<b>Medium</b>	16.7 ± 11.0 <sup>A</sup>	5.8 ± 3.5 <sup>A</sup>	-
<b>Slow</b>	18.5 ± 4.6 <sup>A</sup>	8.4 ± 2.1 <sup>B</sup>	0.0031
<b>VCL</b>	47.9 ± 10.3 <sup>A</sup>	26.4 ± 3.5 <sup>B</sup>	0.0022
<b>VAP</b>	25.5 ± 8.3 <sup>A</sup>	12.7 ± 2.3 <sup>B</sup>	0.0114
<b>VSL</b>	18.1 ± 8.3 <sup>A</sup>	8.0 ± 3.0 <sup>B</sup>	0.0329
<b>ALH</b>	1.5 ± 0.3 <sup>A</sup>	0.9 ± 0.4 <sup>A</sup>	-
<b>BFC</b>	7.7 ± 3.6 <sup>A</sup>	3.5 ± 2.1 <sup>A</sup>	-
<b>STR</b>	60.14 ± 13.5 <sup>A</sup>	49.5 ± 9.9 <sup>A</sup>	-
<b>LIN</b>	33.9 ± 15.1 <sup>A</sup>	24.6 ± 12.9 <sup>A</sup>	-
<b>WOOB</b>	50.3 ± 15.1 <sup>A</sup>	42.5 ± 12.7 <sup>A</sup>	-

The parameters: Intact plasma membrane (PMI), percentage of mobile cells (MOT), percentage of mobile progressive cells (PMOT), fast speed sperm, medium speed sperm, slow speed sperm, path speed (VCL), average path speed (VAP), progressive speed (VSL), progressive displacement (VSL), lateral head displacement (ALH), straightness (STR) and linearity (LIN), wobble coefficient (WOOB), Beating frequency (BFC).

A,B - Values followed by capital letters show differences between treatments ( $P < 0.05$ ).

**Figure captions:**

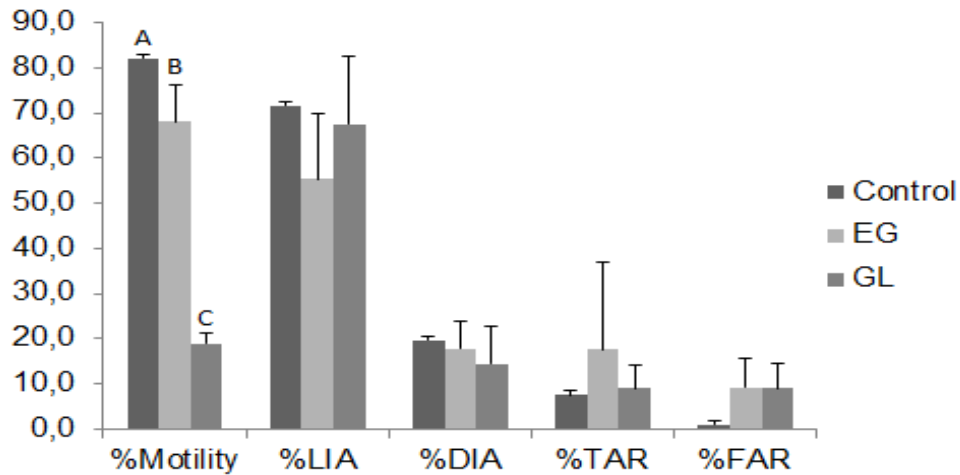


Figure 1 (grayscale): Mean and standard deviation of motility, plasma and acrosomal membrane integrity of cat epididymal sperm before (control) and after vitrification with ethylene glycol and glycerol. Data from five ( $n = 5$ ) distinct tomcats. % LIA - Live sperm with intact acrosome, % DIA - Dead sperm with intact acrosome, % TAR Live sperm with detached acrosome, % FAR - Dead sperm with detached acrosome. TAR, FAR = true and false acrosome reactions.

A,B,C - Values followed show differences between treatments ( $P < 0.05$ ).



Figure 2 (Colored): Assessment of plasma membrane and acrosomal integrity by fluorescent probes (H33342 / PI) and Trypan Blue/Giemsa staining from post-vitrified epididymal cat spermatozoa. A - sperm cells emitting fluorescence by H33342. B - Same field emitting fluorescence by PI. C - 1) spermatozoa with intact plasma membrane and 2) spermatozoa with detached acrosomes.



intact plasma membrane and acrosome and 2) spermatozoa with damaged plasma membrane and intact acrosome at 100x magnification.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nas duas fases desta dissertação permitiram concluir que:

- A osmolaridade do diluidor pode afetar positivamente ou negativamente a manutenção dos parâmetros espermáticos de espermatozoides da cauda do epidídimo;
- As osmolaridades do diluidor Tris-citrato de 325 e 375 mOsm permite a obtenção de espermatozoides com boa qualidade, a manutenção dos parâmetros espermáticos, bem como a manipulação espermática durante uma hora sem alterar sua qualidade;
- Após a congelação o crioprotetor glicerol a 4% acrescido de 20% de gema de ov, na osmolaridade 375 mOsm foi considerado o mais viável para manutenção dos parâmetros espermáticos de espermatozoides epididimários de gatos domésticos;
- Foi possível desenvolver um protocolo eficaz de vitrificação de equilíbrio para a cauda do epidídimo de gatos domésticos, utilizando a técnica de SSV;
- Utilizando o etilenoglicol a 40 % associado com sacarose (0,1 M) na vitrificação da cauda do epidídimo foi possível a conservação dos espermatozoides epididimários, obtendo resultados positivos, na motilidade, vigor espermático e integridade de membrana plasmática/acrossomal, e elevando com isso a qualidade espermática após a vitrificação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvarenga M. A., Landim-Alvarenga F. C., Moreira R. M., Cesarino M. M. 2000. Acrosomal ultrastructure of stallion spermatozoa cryopreserved with ethylene glycol using two packaging systems. *Equine Vet J*, v.32, p.541-545.

Alvarenga M. A., Papa F. O., Landim-Alvarenga F. C., Medeiros A. S. L. 2005. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci*, v.89, p.105-113.

Andrews, C. J., Thomas, D. G., Yapura, J. Potter, M. A. 2018. “Reproductive biology of the 38 extant felid species: a review.” *Mammal Review*. V. 49, p. 16–30.

Axner, E., Hermansson, U., Linde-Forsberg, C., 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 84, 179–191.

Baillie, J.E.M., Hilton-Taylor, C., Stuart, S.N. 2004. IUCN Red List of Threatened Species. A Global Species Assessment. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK Xxiv, 191 pp.

Balaban, B., Urman, B., Ata, B., Isiklar, A., Larman, M.G., Hamilton, R. & Gardner D.K. 2008. A randomized controlled study of human day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum Reprod.* 23(9):1976- 1982.

Bhattacharya, S. 2018. Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process. *Cryopreservation Biotechnology in Biomedical and Biological Sciences*. doi:10.5772/intechopen.80477.

Belleannee, C.; Thimon, V.; Sullivan, R. 2012. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Research*, v. 349, n. 3, p. 717-31, ISSN 1432-0878.

Bogliolo, L., Leoni, G., Ledda, S., Naitana, S., Zedda, M., Carluccio, A., Pau, S. 2001. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen-thawed epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 56, 955–967.

Bóveda, P., Estes, M.C, Castaño, C., Toledano-Dizaz, A., López-Sebastian, A., Muniz, A., Prieto, P., Mejía, O., Ungerfeld, R., Santiago-Moreno, J. 2018. Slow and ultra-rapid

freezing protocols for cryopreserving Mouflon (*Ovis Musimon*) and fallow deer (*Dama Dama*) epididymal Sperm. *Anim Reprod Sci*, v.192, p.193-199.

Buranaamnuay, K., 2013. Sperm-TALP: an alternative extender for retrieving and diluting epididymal sperm in the domestic cat. *Reprod. Domest. Anim.* 48, 912–917.

Buranaamnuay, K., 2015. Determination of appropriate cryopreservation protocols for epididymal cat spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 50, 378–385.

Carvalho AA, Faustino LR, Figueiredo JR, Rodrigues APR, Costa APR. Vitriificação: uma alternativa para a preservação de embriões e material genético de fêmeas mamíferas em criobancos. *Acta Veterinaria Brasilica*, p.14, 2011.

Caturla-Sánchez, E., Sánchez-Calabuig, M. J., Pérez-Gutiérrez, J. F., Cerdeira, J., Castaño, C., Santiago-Moreno, J. 2018. Vitrification of dog spermatozoa: effects of two cryoprotectants (sucrose or trehalose) and two warming procedures. *Cryobiology*, v.80, p.126-129.

Chatdarong, K., Thuwanut, P., Manee-in, S., Lohachit, C., Axner, E. 2010a .Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 221–227.

Chatdarong, K., Thuwanut, P., Morrell, J.M. 2010b . Single-layer centrifugation through colloid selects improved quality of epididymal cat sperm. *Theriogenology* 73, 1284–1292.

Chatdarong, K., Thuwanut, P., Suksamai, P., Patanatiradaj, S., Sangwornrachasup, A. 2009. Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (Suppl. 2), 377–380.

Chian, R.C.; Kuwayama, M.; Tan, L.; Tan, J.; Kato, O.; Nagai, T. 2004. High survival rate of bovine oocytes matured in vitro following vitrification. *The Journal of Reproduction and Development*, Tokyo, v. 50, n. 6, p. 685-696.

Cocchia, N., Ciani, F., El-Rass, R., Russo, M., Borzacchiello, G., Esposito, V., Montagnaro, S., Avallone, L., Tortora, G., Lorizio, R. 2009. Cryopreservation of feline epididymal spermatozoa from dead and alive animals and its use in assisted reproduction. *Zygote* 18, 1–8.

Dominguez F, Castello D, Remohi J, Simón C, Cobo A. Effect of vitrification on human oocytes: a metabolic profiling study. *Fertil Steril*, v.99, n.2, p.565-572.e3, 2013.

Di Santo, M., Tarozzi, N., Nadaliniw, M., and Borini, A. 2012. Human sperm cryopreservation: Update on techniques, effect on DNA integrity, and implications for art. *Adv Urol*; 854837.

Fahy, G.M. , MacFarlane, D. R., Angell, C.A., Maryman, H. T. 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, v.21, n.4, p.407-426.

Fernandes, A.C., Herold, B., Maia, H., Rauter, A. M., Rodrigues, J.A.R. 2002. Guia IUPAC para a nomenclatura de compostos orgânicos. Lisboa: Lidel. 220p.

Fickel, J., Wagener, A., Ludwig, A. 2007. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. *Eur J Wildl Res*, v.53, p.81-89.

França, L.R., Avelar, G. F., Almeida, F. F. 2005. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs. *Theriogenology* 63: 300-318.

Ganan, N., Gomendio, M., Roldan, E.R. 2009. Effect of storage of domestic cat (*Felis catus*) epididymides at 5 °C on sperm quality and cryopreservation. *Theriogenology* 72, 1268–1277.

Gatti JL, Castella S, Dacheux F, Ecroyd H, Métayer S, et al. 2004. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci* 82-83: 321-39.

Gilmore, J.A., Liu, J., Gao, D.Y., & Critser, J. K . 1997. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Human Reproduction* 12 112–118.

Gosden, R. 2011. Cryopreservation: a cold look at technology for fertility preservation. *Fertility and Sterility*, v. 96, n. 2, p. 264-268.

Guthrie HD, Liu J,Critser JK. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on motility of bovine spermatozoa. *Biol Reprod*, v.67, n.6, p.1811-1816, 2002.

Hammadeh, M.E., Dehn, C., Hippach, M., Zeginiadou, T., Stieber, M., Georg, T., Rosenbaum, P., and Schmidt, W. 2001.Comparison between computerized slow-stage

and static liquid nitrogen vapour freezing methods with respect to the deleterious effect on chromatin and morphology of spermatozoa from fertile and subfertile men. *Int. J. Androl*; 24: 66–72.

Hay, M.A., Goodrowe, K.L. 1993. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J. Reprod. Fertil.* 297–305.

Hermansson, U.; Axné, E. 2007. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 °C. *Theriogenology*, v. 67, p. 1239-1248.

Holt WV. Basic aspects of frozen storage semen. *Anim Reprod Sci*, v.62, p.3-22, 2000.

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I. I., Dessole, S., Nawroth, F. 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to present success. *Reproductive BioMedicine Online*, v.6, n.2, p.191-200.

Isachenko, E., Isachenko, V., Rahimi, G. & Nawroth, F. 2003. Cryopreservation of human ovarian tissue by direct plunging into liquid nitrogen. *Eur J Obstet Gynecol Reprod.* 108(2):186-193.

Isachenko, E., Isachenko, V. & Sanchez, R. 2015: Protective effect of butylated hydroxytoluene on sperm function in human spermatozoa cryopreserved by vitrification technique. doi: 10.1111/and.12246. *Andrologia*, 47, 186–193.

Jervis, K. M., Robaire, B. 2001. Dynamic changes in gene expression along the rat epididymis. *Biol Reprod*, v.65, p.696-703.

Jimenez, E., Perez-Marin, C.C., Vizuete, G., Millan, Y., Aguera, E.I. 2013. Effect of different extenders on in vitro characteristics of feline epididymal sperm during cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 48, 665–672.

Jiménez-Rabadán, P., García-Álvarez, O., Vidal, A., Maroto-Morales, A., Iniesta-Cuerda, M., Ramón, M., del Omo, E., Fernández-Santos, R., Garde, J. J., Soler, A. J. 2015. Effects of vitrification on ram spermatozoa using free-egg yolk extenders. *Cryobiology*, v.71, n.1, p.85-90.

Johnston, S.D.; Kustritz, M.V.R.; Olson, P.N.S. 2001. Canine and feline theriogenology. Philadelphia: W.B.Saunders.

Joseph A, Yao H, Hinton BT. 2009. Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns. *Dev Biol* 325: 6-14.

Kashiwazaki, N., Okuda, Y., Seita, Y., Hisamatsu, S., Sonoki, S., Shino, M., Masaoka, T., Inomata, T. 2006. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese White Rabbit spermatozoa. *J Reprod Dev*, v.52, p.511-516.

Kashiwazaki, N., Yamaguchi, R., Uesugi, R., Hishiyama, N., Kim, M., Nakatsukasa, E., Kojima, Y., Okuda, Y., Hisamatsu, S., Inomata, T., Shino, M. 2005. Sperm motility, plasma membrane integrity, and binding capacity to homologous zona pellucida of cryopreserved epididymal spermatozoa in the domestic cat. *J. Reprod. Dev.* 51, 735–739.

Karja, N.W., Otoi, T., Murakami, M., Fahrudin, M., Suzuki, T., 2002. In vitro maturation, fertilization and development of domestic cat oocytes recovered from ovaries collected at three stages of the reproductive cycle. *Theriogenology* 57, 2289–2298.

Kedam, T., Katepogu, K.; Beeram, E. 2016. Effect of Cryopreservation on Rat Epididymis - A Histological Analysis. *Journal of Biomedical Sciences*. Vol.5 No.2:11.

Klaus, C., Eder, S., Franz, C., Muller, K. 2016. Successful cryopreservation of domestic cat (*Felis catus*) epididymal sperm after slow equilibration to 15 or 10 °C. *Reprod. Domest. Anim.* 51, 195–203.

Kunkitti, P., Axner, E., Bergqvist, A.S., Sjunnesson, Y., 2016a. In vitro fertilization using frozen-thawed feline epididymal spermatozoa from corpus and cauda regions. *Theriogenology* 86, 1403–1408.

Kunkitti, P., Bergqvist, A.S., Sjunnesson, Y., Johannisson, A., Axner, E., 2016b. The tolerance of feline corpus and cauda spermatozoa to cryostress. *Theriogenology* 85, 502–508.

Kunkitti, P.; Chatdarong, K.; Suwimonteerabutr, J.; Nedumpun, T.; Johannisson, A.; Bergqvist, A. S.; Sjunnesson, Y.; Axner, E. 2017. Osmotic tolerance of feline epididymal spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. Oct; v.185. p.148-153.

Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção, 2018: Volume I / -- 1. ed. -  
- Brasília, DF: ICMBio/MMA. 492 p. : il., gráfs., tabs. ISBN: 978-85-61842-79-6.

Lengwinat, T., Blottner, S., 1994. In vitro fertilization of follicular oocytes of domestic cat using fresh and cryopreserved epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 35, 291–301.

Luyet, B.J. 1937. The ultrarapid freezing of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica*. 1:1-14.

Luvoni GC. 2006: Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 66 (1), 101-11.

Luvoni, G. C. 2013. Recent advances in fertility preservation of dogs and cats. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 37, n. 2, p.169-171.

Luvoni, G.C., Ruggiero, C., Marinoni, G., Kalchschmidt, E. 2002. Effect of taurine-containing diluent for cryopreservation of domestic cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology* 57, 466.

Manee-in, S., Parmornsupornvichit, S., Kraiprayoon, S., Tharasanit, T., Chanapiwat, P., Kaeoket, K. 2014. L-carnitine supplemented extender improves cryopreservedthawed cat epididymal sperm motility. *Asian Aust. J. Anim. Sci.* 27, 791–796.

Martins, J.L., Villaverde, A.I., Lima, A.F., Steagall, P.V., Ferreira, J.C., Taconeli, C.A., Lopes, M.D., 2009. Impact of 24-h cooling prior to freezing on the survival of domestic cat (*Felis catus*) epididymal sperm. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (2), 366–368.

Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? *Theriogenology*, v.57, p.327-344, 2002.

Mukaida, T., Nakamura, S., Tomiyama, T., Wada, S., Oka, C., Kasai, M. & Takahashi K. 2003. Vitrification of human blastocysts using cryoloops: clinical outcome of 223 cycles. *Hum Reprod.* 18(2):384-391.

Naik, B.R., Rao, B.S., Vagdevi, R., Gnanprakash, M., Amarnath, D. & Rao, V.H. 2005. Conventional slow freezing, vitrification and open pulled straw (OPS) vitrification of rabbit embryos. *Anim Reprod Sci.* 86(3-4):329-338.



Nunes, J. F. 2002. Inseminação artificial em caprinos. In: Gonsalvez PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: Varela. p.111-125.

Oliveira, E. C. S., Juliani, G. C., Marques, Jr. A. P., Henry, M. 2006. In vitro evaluation of canine spermatozoa cryopreserved in different extenders. Arq Bras Med Vet Zootec, v.58, p.1116-112.

Prentice, J.R., Anzar, M. 2011. Cryopreservation of Mammalian Oocyte for Conservation of Animal Genetics. Veterinary Medicine International Article ID 146405, 11 pages, 2011. doi:10.4061/2011/146405.

Pukazhenti, B. S, Neubauer, K., Jewgenow, K., Howard, J., Wildt, D.E., 2006: The impact and potential etiology of teratospermia in the domestic cat and its wild relatives. Theriogenology 66 (1), 112- 21.

Purdy, P. H. 2006. A review on goat sperm cryopreservation. Small Rumin Res, v.63, p.215-225.

Rall, W.F. & Fahy, G.M. 1985. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at 196°C by vitrification. Nature. 313:573–5.

Reid, B. L., Cleland, K. W. 1957. The structure and function of the epididymis. The histology of the rat epididymis. Aus J Zool 5: 223-246.

Rijsselaere, T., Van Soom, A. 2010. Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. Vlaams. Diergeneeskundig. Tijdschrift. V.79, p.467–470.

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.

Rosato MP, Iaffaldano N. 2013. Cryopreservation of rabbit semen: comparing the effects of different cryoprotectants, cryoprotectant-free vitrification, and the use of albumin plus osmoprotectants on sperm survival and fertility after standard vapor freezing and vitrification. Theriogenology, v.79, n.3, p. 508-516.

Rota, A., Milani, C., Cabianca, G., & Martini, M. 2006. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology*, 65(9), 1848–1858.

Sánchez, R., Risopatrón, J., Schulz, M., Villegas, J., Isachenko, V., Kreinberg, R., Isachenko, E. 2011. Canine sperm vitrification with sucrose: effect on sperm function: vitrification and dog sperm physiology. *Andrologia*, v.43, n.4, p. 233-241.

Schafer, S., Holzmann, A., 2000. The use of transmigration and spermac stain to evaluate epididymal cat spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 59, 201–211.

Siemieniuch, M., Dubiel, A. 2007. Preservation of tomcat (*Felis catus*) semen in variable temperatures. *Anim. Reprod. Sci.* 99, 135–144.

Site: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso 01 de setembro de 2019.

Slabbert, M., Du, Plessis, S.S., Huyser, C. 2014. Large volume cryoprotectant-free vitrification: an alternative to conventional cryopreservation for human spermatozoa. *Andrologia*, v.47, n.5, p. 594-599.

Salamon, S.; Maxwell, W.M.C. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.77-111, 2000.

Sripunya, N.; Somfai, T.; Inaba, Y.; Nagai, T.; Imai, K.; Parnpai, R. 2010. A comparison of cryotop and solid surface vitrification methods for the cryopreservation of in vitro matured bovine oocytes. *The Journal of Reproduction and Development*, Tokyo, v. 56, n. 1, p. 176-181.

Stachecki, J.J., Ginsburg, K.A., Amant, D.R. 1994. Stimulation of cryopreserved epididymal spermatozoa of the domestic cat using the motility stimulants caffeine, pentoxifylline, and 2'-deoxyadenosine. *J. Androl.* 15, 157–164.

Swanson, W., Bateman, H., Vansandt, L. 2017. Urethral catheterization and sperm vitrification for simplified semen banking in felids. *Reprod Domest Anim*, v.52, p.255-260.

Tebet, J. M., Martins, M.I.M., Chirinea, V.H., Souza, F.F., Campagnol, D., Lopes, M.D. 2006: Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology*. v.66. p.1629–1632.

Tebet JM. Efeito da criopreservação sobre a célula espermática em três espécies de felinos: a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o tigrina (*L. tigrinus*) e o gato doméstico (*Felis catus*). 2004. 117f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2004.

Thuwanut, P., Chatdarong, K. 2009a. Incubation of post-thaw epididymal cat spermatozoa with seminal plasma. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (2), 381–384.

Thuwanut, P., Chatdarong, K., Techakumphu, M., Axner, E., 2008. The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of frozenthawed epididymal cat spermatozoa. *Theriogenology* 70, 233–240.

Thuwanut, P., Axner, E., Johanisson, A., Chatdarong, K., 2009b. Detection of lipid peroxidation reaction in frozen-thawed epididymal cat spermatozoa using BODIPY581/591 C11. *Reprod. Domest. Anim.* 44 (2), 373–376.

Thuwanut, P., Chatdarong, K., Johanisson, A., Bergqvist, A.S., Soderquist, L., Axner, E., 2010. Cryopreservation of epididymal cat spermatozoa: effects of in vitro antioxidative enzymes supplementation and lipid peroxidation induction. *Theriogenology* 73, 1076–1087.

Tongdee, P.; Sukprasert, M.; Satirapod C.; Wongkularb A.; Choktanasiri, w. 2015. Comparison of Cryopreserved Human Sperm between Ultra Rapid Freezing and Slow Programmable Freezing: Effect on Motility, Morphology and DNA Integrity. *J Med Assoc Thai*; 98 (Suppl. 4): S33-S42.

Toyonaga, M., Kaihara, A., Tsutsui, T. 2011a. The quality of cryopreserved sperm collected from feline caudal epididymides stored at room temperature. *J. Vet. Med. Sci.* 73, 1395–1398.

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.* 72, 777–780.

Toyonaga, M., Sato, Y., Sasaki, A., Kaihara, A., Tsutsui, T. 2011b. Artificial insemination with cryopreserved sperm from feline epididymides stored at 4 °C. *Theriogenology* 76, 532–537.

Toyonaga, M., Tsutsui, T. 2012. The quality of cryopreserved sperm collected from feline caudal epididymides using seminal plasma. *J. Vet. Med. Sci.* 74, 1349–1353.

- Tsutsui, T.; Wada, M.; Anzai, M.; Hori, T. 2003. Artificial Insemination with frozen epididymal sperm in cats. *Journal of Veterinary Medicine Science*, v. 65, p. 397- 399.
- Vansandt LM, Bateman HL, Newsom J, Swanson WF. 2016. Getting the yolk out: The use of a soy lecithin-based cryomedium for semen banking in the Pallas' cat and fishing cat. *Reprod Fertil Dev*, v.29, p.165-166.
- Varesi, S. 2012. Canine epididymal spermatozoa: characteristics, collection and cryopreservation. 2012. 115f. Tese (Doctoral Program in Veterinary Clinical Sciences) - Università degli Studi di Milano, Milano.
- Verberckmoes, S., van Soom, A., de Pauw, I., Dewulf, J., Rijsselaere, T., de Druif, A. 2004. Effect of whole blood and serum on bovine sperm quality and in vitro fertilization capacity. *Theriogenology* 61, 25–33.
- Vernocchi, V.; Morselli, M. G.; Consiglio, A. L.; Faustini, M.; Luvoni, G. C. 2014. DNA fragmentation and sperm head morphometry in cat epididymal spermatozoa. *Theriogenology*, v. 82, p. 982-987.
- Villaverde, A. I. S. B.; Melo, C. M.; Martin, I.; Ferreira, T. H.; Papa, F. O.; Taconeli, C. A.; Lopes, M. D. 2009. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*): artificial insemination in domestic cats. *Animal Reproduction Science*, v. 114, p. 434-442.
- Villaverde, A.I., Fioratti, E.G., Penitenti, M., Ikoma, M.R., Tsunemi, M.H., Papa, F.O., Lopes, M.D. 2013. Cryoprotective effect of different glycerol concentrations on domestic cat spermatozoa. *Theriogenology*. V.80, p.730–737.
- Vizuite, G., Jiménez, E., Aguera, E. I., Pérez-Marin, C. C. 2014. Impact of ultra-rapid freezing on the motility, morphology, viability and acrosome integrity of epididymal cat sperm diluted in sucrose-based extenders. *Reprod Domest Anim*, v.49, n.1, p.e5-e8.
- Vutyavanich, T., Piromlertamorn, W., Nunta, S. 2010. Rapid freezing versus slow programmable freezing of human spermatozoa. *Fertil Steril*; 93: 1921–8.
- Wei Si JD, Benson HM, John KC. Osmotic tolerance limits and effects of cryoprotectants on the motility, plasma membrane integrity and acrosomal integrity of rat sperm. *Cryobiology*, v.53, p.336–348, 2006.

Wildt, D.E.; Comizzoli, P.; Pukazhenti, B.; Songsasen, N. 2010. Lessons from biodiversity—the value of nontraditional species to advance reproductive science, conservation, and human health. *Molecular Reproduction Development*, v.77, p.397-409.

Zambelli, D., Prati, F., Cunto, M., Iacono, E., Merlo, B. 2008. Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology* v.69, p.485–490.