



Faculdade de Veterinária

Departamento de Clínicas

Trabalho de Culminação de Estudo

**Efeito do Tempo Pós-abate na Viabilidade dos Espermatozóides Recuperados do
Epidídimo em Bodes**

Autora: Dora Chelsea Cossa

Supervisora: Prof. Doutora Laurinda Augusto

Maputo, Dezembro de 2025

DECLARAÇÃO DE HONRA

Eu, Dora Chelsea Cossa, declaro, para os devidos fins, que este trabalho de conclusão de curso intitulado **Efeito do Tempo na Viabilidade dos Espermatozóides Recuperados do Epidídimo em Bodes** é de minha autoria e da orientação da minha supervisora. Declaro ainda, que todas as fontes de informação utilizadas estão devidamente citadas e referenciadas conforme as normas da instituição. Este trabalho nunca foi usado para a obtenção de qualquer grau académico nesta ou em qualquer outra instituição de ensino.

Maputo, Dezembro de 2025

(Dora Chelsea Cossa)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe, Cláudia Chaguala, com todo o meu amor, admiração e gratidão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela saúde e pelas oportunidades. Por sempre me iluminar e abençoar, me mostrando diariamente, em pequenos detalhes, o quanto sou amada e protegida por sua luz divina.

A minha mãe e meu pai (em memória), por serem meu alicerce, por todo amor, incentivo e por sempre acreditarem nos meus sonhos. Agradeço em especial a minha mãe, pelo apoio constante e presença em cada etapa desta caminhada.

À minha supervisora Professora Dra. Laurinda Augusto, pela orientação e por sempre dispor seu tempo e pela oportunidade confiada a mim de trabalhar neste tema.

Agradeço sinceramente, dr. Douglas Cossa, pelo apoio, disponibilidade e valiosas contribuições durante a realização deste trabalho. Sua orientação técnica e incentivo foram fundamentais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Sr. Langa pela paciência, dedicação e compreensão durante as actividades experimentais, que foram essenciais para a realização deste estudo.

Aos meus amigos da faculdade, Jeny Yudemila, Carmen Alberto, Marven Tchauque, Nércia das Neves, Shanice Machava, Antonina da Liz, Sheron Mazembe, agradeço por toda a ajuda, pela amizade diária e pelos momentos de estudo e distração.

ABREVIATURAS E SIGLAS

Et al – E colaboradores

GnRH - Hormônio Libertador de Gonadotrofina

LH - Hormônio Luteinizante

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

IA – Inseminação Artificial

cm – Centímetros

ICSI - Injeção intracitoplasmática

FIV – Fertilização in Vitro

DNA – Ácido desoxirribonucleico

Kg – Quilograma

FAVET – Faculdade de Veterinária

mL – milímetro

Ph – Potencial hidrogénico

H – Horas

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Percentagem

® - Marca registrada

°C – Graus Celsius

LISTA DE FIGURAS

Figura I: Representação esquemática do sistema tubular dos testículos e epidídimo.

Figura II: Transporte dos testículos na caixa de isopor

Figura III: Bolsa escrotal com testículos

Figura IV: Complexo testículo epidídimo

Figura V: Cauda do Epidídimo isolada dos testículos

Figura VI: Cauda do epidídimo com incisão

Figura VII: Material na platina térmica

Figura VIII: Espermatozóides corados com eosina-negrosina, 1 horas pós-abate

Figura IX: Espermatozóides corados com eosina-negrosina, 5 horas pós-abate

Figura X: Espermatozóides corados com eosina-negrosina, 7 horas pós-abate.

LISTA DE TABELA

Tabela I: Resultados da mobilidade massal, individual e supravitais em diferentes horas pós abate.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico I: Resultados da motilidade massal

Gráfico II: Resultados da motilidade progressiva

Gráfico III: Resultados de supravitais

ÍNDICE

1. RESUMO.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	2
3. OBJECTIVOS.....	5
3.1. Geral.....	5
3.2. Específicos.....	5
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
4.1. Anatomia do aparelho reprodutor de caprinos.....	6
4.2. Produção e maturação dos espermatozóides	7
4.3. Papel do epidídimo na maturação, transporte e armazenamento dos espermatozóides	8
4.4. Colheita de espermatozóides do epidídimo.....	10
4.4.1. Métodos de colheita de espermatozóides na cauda do epidídimo	11
4.5. Qualidade dos espermatozóides epididimário	13
4.6. Métodos de avaliação da qualidade do espermatozoides	13
I. Motilidade massal:	13
II. Mobilidade individual.....	14
III. Prova de supravitais:	14
4.7. Factores que afectam a integridade da membrana e o potencial fertilizante	15
4.8. Alterações fisiológicas após a morte do animal	16
4.9. Efeito do tempo após o abate na viabilidade dos espermatozóides epididimários.....	16
4.10. Conservação de espermatozóides epididimários por refrigeração.....	17
4.11. Aplicação de espermatozóide epididimário em IA, FIV e ICSI	18
4.12. Sucesso reprodutivo em IA e FIV com espermatozóides epididimários.....	18
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	20
5.1. Local de estudo.....	20
5.2. Amostragem e critérios de inclusão.....	20

5.3. Colheita e transporte dos testículos	20
5.4. Recuperação dos espermatozóides no epidídimo	20
6. RESULTADOS	23
7. DISCUSSÃO.....	27
8. CONCLUSÃO	30
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. RESUMO

A recuperação de espermatozóides na cauda do epidídimo é uma técnica utilizada para preservar o material genético de animais de grande valor zootécnico, especialmente em situações de morte repentina. O objectivo deste estudo foi avaliar o efeito do tempo após-abate sobre a qualidade dos espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de bodes. Foram utilizados dez pares de testículos juntamente com epidídimo obtidos de bodes adquiridos no mercado informal de “Xiquelene”, imediatamente após o abate e encaminhados ao laboratório de Reprodução na Faculdade de Veterinária na caixa de isopor com gelo. No laboratório foram submetidos a diferentes intervalos de tempo de recuperação de sémen, de uma, três, cinco e sete horas. O sémen foi recuperado pelo método de incisão, tendo se avaliado os seguintes parâmetros: motilidade massal, individual e supravitais. Os resultados obtidos neste estudo revelaram que as células espermáticas continuam viáveis até 5 horas. O presente estudo é de grande importância, uma vez que pode contribuir para estratégias de conservação genética em programas de reprodução assistida em Bodes.

Palavras-chave: Bodes, Conservação, Espermatozóides, Viabilidade Espermática.

2. INTRODUÇÃO

A criação de caprinos é uma prática que tem tido cada vez mais destaque em todo o mundo assim como em Moçambique. A caprinocultura tem sido uma fonte de renda para os produtores rurais, estes que através da comercialização de animais vivos assim como abatidos ou pela venda do leite tem gerado renda para a sua subsistência (Costa *et al.*, 2010).

Em Moçambique o efetivo de caprinos até o ano de 2020 era de 4,898.306 cabeças, sendo o segundo efetivo mais produzido depois das galinhas nesse ano. A província de Tete é a que detém o maior efetivo, com cerca de 22,3% do efetivo total e são criados maioritariamente num sistema extensivo para corte (MADER, 2020).

Um dos factores determinantes para o sucesso na criação de caprinos é a capacidade reprodutiva dos bodes, pois estes são responsáveis por disseminar o material genético para um grande número de fêmeas, e actualmente com o uso de Biotecnologias de reprodução, como por exemplo a Inseminação Artificial (IA) é possível cobrir um número ainda maior de fêmeas (Bezerro, 2010).

As biotecnologias reprodutivas são importantes na reprodução animal, pois promovem a conservação do germoplasma por tempo indeterminado e reduzem custos para o produtor na alimentação e transporte dos reprodutores assim como riscos de transmissão de doenças (Castelo, 2008).

Segundo Chongo (2014), em sistemas extensivos, que são os mais usados em Moçambique, os animais podem morrer durante a pastagem por ingestão de alguma planta tóxica ou água contaminada. Além disso, os animais estão expostos a factores de risco como acidentes por mordedura de cobras, electrocussão, doenças infectocontagiosas e brigas entre machos dominantes.

Já em sistemas intensivos ou semi-intensivos, acidentes podem acontecer durante o transporte para feiras, exposições e leilões que podem levar a morte do animal (Chongo, 2014).

A aplicação de técnicas de reprodução assistida para preservação de espécies, como a recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo de animais

mortos representa uma opção para preservar gâmetas masculinos de animais de alto valor genético ou de interesse zoológico que chegam a óbito de forma inesperada (Kaabi, 2003).

A cauda do epidídimo em mamíferos é responsável pelo armazenamento de espermatozóides, até o momento da ejaculação e promove um ambiente favorável às células, preservando sua capacidade de fertilização por algumas semanas (Jones, 2004).

A colheita de espermatozóides no epidídimo, tem sido utilizada, em diversas espécies de animais domésticos (Granemann, 2006a; Lima *et al.*, 2016; Benítez *et al.*, 2017) assim como animais silvestres (Martinez-Pastor *et al.*, 2006), é utilizado como um recurso importante na coleção de recursos genéticos em espécies de animais em perigo de extinção (Benítez *et al.*, 2017).

A recuperação de espermatozóides da cauda do epidídimo pode ser a última chance de preservação do material genético quando ocorre morte ou lesão grave em machos de alto valor genético, pois após a morte os espermatozóides permanecem viáveis no epidídimo por algum tempo até que a decomposição afete sua viabilidade (Monteiro *et al.*, 2009). Este é um método útil para resgatar espermatozóides de animais mortos que de outra forma seriam perdidos (García-Álvarez *et al.*, 2009).

Quando recuperados pouco tempo após a morte, os espermatozóides da cauda do epidídimo demonstram a mesma qualidade do sémen colhido em vagina artificial (Álvarez *et al.*, 2012) e melhor qualidade quando comparado ao sémen colhido por electro ejaculação (García-Álvarez *et al.*, 2009). No entanto, a viabilidade espermática nesta questão depende basicamente do tempo que o animal morto permaneceu no ambiente e também das características climáticas da região naquele momento (Martins *et al.*, 2008).

Com o sucesso da inseminação artificial e aperfeiçoamento dos processos de diluição, criopreservação e descongelamento do sémen, na presença ou não do plasma seminal, é possível minimizar as perdas de material genético quando um animal for a óbito inesperadamente ou quando não for possível colher seu material genético *in vivo*, pelos métodos convencionais, é possível recorrer aos espermatozóides dos epidídimos (Granemann *et al.*, 2006b).

O presente estudo tem como principal objectivo determinar o efeito do tempo na qualidade dos espermatozóides colhidos na cauda de epidídimo em caprinos recém abatidos.

3. OBJECTIVOS

3.1. Geral

- Determinar o efeito do tempo na viabilidade de espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo em bodes recém abatidos.

3.2. Específicos

- Avaliar o efeito do tempo na mobilidade massal, mobilidade progressiva e a percentagem de espermatozóides vivos;
- Determinar o tempo máximo após o abate no qual o espermatozoide ainda mantém os parâmetros mínimos de qualidade para o uso em biotecnologias da reprodução.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A presente revisão bibliográfica aborda aspectos fundamentais do aparelho reprodutor de caprinos, com foco especial na produção, maturação e armazenamento dos espermatozóides. Destaca-se o papel da cauda do epidídimo como local de concentração, reserva funcional e ainda a obtenção de espermatozóides viáveis após o abate.

A revisão discute ainda os parâmetros utilizados para avaliar a qualidade seminal no epidídimo, incluindo motilidade, integridade de membrana e indicadores de viabilidade, assim como os factores que influenciam essa qualidade, com destaque para o tempo pós-abate e as condições de conservação.

Por fim, evidencia-se a aplicação prática dos espermatozóides epididimários na reprodução assistida, mostrando sua importância para a preservação de material genético e melhoria de programas reprodutivos.

4.1. Anatomia do aparelho reprodutor de caprinos

O aparelho genital dos caprinos é composto por um par de testículos, epidídimos, bolsa escrotal, canais deferentes, glândulas anexas, uretra, pênis e prepúcio. Os testículos apresentam forma ovoide consideravelmente comprimidos transversalmente, e estão inseridos na bolsa escrotal (Goyal e Memon, 2016; Rodriguez-Martinez, 2021).

Os testículos exercem duas funções principais: a **espermatoogénese**, responsável pela produção de espermatozóides, e a **esteroidogénese**, que promove a síntese de andrógenos, como a testosterona, que é fundamental para manter as características sexuais secundárias e a função reprodutiva (Dellmann e Eurell, 2002; Junqueira e Carneiro, 2013).

A regulação da espermatoogénese e da esteroidogénese ocorre por meio do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal. O hipotálamo secreta a hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH), que estimula a hipófise anterior a produzir hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). O LH actua nas células de Leyding, promovendo a produção de testosterona, enquanto o FSH age nas células de Sertoli, auxiliando no processo de maturação das células germinativas.

A testosterona é essencial não apenas para o desenvolvimento das características sexuais secundárias e manutenção da libido, mas também para o funcionamento normal dos túbulos seminíferos e a espermatogénese contínua (Hafez e Hafez, 2004).

4.2. Produção e maturação dos espermatozóides

Nos caprinos, o processo de produção e maturação dos espermatozóides ocorre nos testículos e epidídimos, sendo essencial para a fertilidade e o sucesso reprodutivo (Dellmann e Eurell, 2002; Junqueira e Carneiro, 2013).

A espermatogénese é o processo onde ocorre a produção e maturação dos espermatozóides, é altamente organizado que se desenvolve no interior dos túbulos seminíferos, a partir de células germinativas primordiais denominados espermatogónios. Estes sofrem sucessivas divisões mitóticas e meióticas até originarem os espermatozóides, que são posteriormente libertados no lúmen tubular (Moore e Persuad, 2008; Alcântara e Toniolli, 2024).

O processo é regulado por estímulos hormonais, pela temperatura testicular, que deve ser de 2 a 4°C inferior à temperatura corporal e por factores ambientais, sendo determinante para a fertilidade (Gwazdauskas, 1985; Miusset e Bujan, 1995; Oduwole *et al.*, 2018).

A espermatogénese compreende três fases: espermatocitogénese, espermiogénese e espermiacção. Na espermatocitogénese, os espermatogónios se dividem sucessivamente até formarem espermatócitos, que passam pela meiose originando espermatídios haploides (Courot *et al.*, 1970a; Alcântara e Toniolli, 2024). Em seguida, na espermiogénese, os espermatídios diferenciam-se em espermatozóides morfológicamente maduros, com formação da cabeça, flagelo e acrossoma, estruturas fundamentais para a motilidade e fecundação (Hafez e Hafez, 2004; Junqueira e Carneiro, 2013; Gao *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2022).

Na espermiacção, os espermatozóides são libertados no lúmen dos túbulos seminíferos, mas ainda são imóveis e inférteis, sendo transportados passivamente para o epidídimo, onde completam a maturação funcional (Hafez e Hafez, 2004; Leal *et al.*, 2004). No epidídimo, ocorrem modificações bioquímicas e estruturais

que conferem motilidade progressiva e capacidade fecundante (Sullivan e Mieusset, 2016)

Após completarem sua maturação, os espermatozóides ficam armazenados na cauda do epidídimo. Quando são libertados dessa região, durante a ejaculação, entram em contacto com as secreções das glândulas acessórias, que desempenham um papel importante na ativação da motilidade espermática inicial (Maxwell *et al.*, 2007; Fagundes *et al.*, 2011). A espermiação constitui o estágio final da espermatogénese e esta diretamente relacionada a morfologia normal dos espermatozóides, influenciando diretamente a fertilidade dos machos (O'Donnell *et al.*, 2011)

O ciclo completo da espermatogénese em caprinos, desde a origem dos espermatogónios até a formação de espermatozóides maduros, leva cerca de 60 a 67 dias. Eles passam por um processo de maturação na cauda do epidídimo, essa etapa essencial onde adquirem motilidade e capacidade de fertilização, que dura em média 10 a 14 dias, num intervalo semelhante em várias espécies (Hafez e Hafez, 2004; França *et al.*, 2005; Viadero *et al.*, 2020)

4.3. Papel do epidídimo na maturação, transporte e armazenamento dos espermatozóides

Segundo Hafez e Hafez (2004), o epidídimo é uma estrutura tubular localizada sobre a superfície do testículo, subdividido em três regiões anatómicas distintas: cabeça, corpo e cauda. Esta estrutura tem funções fundamentais na maturação, transporte e armazenamento dos espermatozóides.

A cabeça do epidídimo é onde os espermatozóides iniciam o processo de maturação, adquirindo gradualmente motilidade e capacidade fecundante e também ocorre a absorção de fluídos e espermiófagia (Hafez, 1970). O corpo do epidídimo, onde os espermatozóides sofrem transformações bioquímicas e estruturais que o confere a capacidade de fecundar. A cauda, por sua vez, representa a porção terminal e dilatada do órgão, situada no polo caudal do testículo, onde ocorre o armazenamento dos espermatozóides e manutenção de espermatozóides maduros (Hafez, 1970; Monteiro *et al.*, 2009).

De acordo com Amann (1981), os espermatozóides que deixam os testículos em direção ao epidídimo ainda são células imaturas e inférteis. A maturação ocorre durante o trânsito epididimário, processo fundamental para o desenvolvimento da motilidade progressiva e da capacidade fecundante. Essa transformação envolve alterações bioquímicas e estruturais mediadas pela interação com proteínas epididimárias específicas, como CRISP1, SPAM1, NPC2 e DCXR, além das vesículas extracelulares denominadas epididimossomos (Sullivan e Mieusset, 2016; Chen *et al.*, 2021; Fernandes *et al.*, 2021).

O microambiente do epidídimo, caracterizado por baixo pH (6,5–6,8), reduzida oxigenação e elevada concentração de potássio, mantém os espermatozóides em estado de quiescência, preservando sua integridade até a ejaculação (Lavanya *et al.*, 2021; Dai *et al.*, 2024). Durante esse período, ocorrem modificações na membrana plasmática, estabilização do DNA nuclear, da peça intermediária e do acrossoma, essenciais para o reconhecimento da zona pelúcida e a fusão com o oócito (Cooper e Yeung, 2003; Pereira *et al.*, 2015).

Estudo de Park e colaboradores (2022), demonstra que espermatozóides colectados da cauda do epidídimo apresentam motilidade significativamente superior e maior competência fertilizante, quando comparados com amostras provenientes da cabeça e do corpo do epidídimo. O mesmo autor refere que este ganho funcional está relacionado ao acúmulo progressivo de proteínas epididimárias e a recodificação da composição do fluido epididimários ao longo do ducto, promovendo alterações estruturais e funcionais nos espermatozóides durante o percurso.

Espermatozóides que não são ejaculados perdem sua viabilidade e são eliminados do organismo, seja por reabsorção pelas células epiteliais do epidídimo ou por eliminação através da urina (Silva *et al.*, 1993).

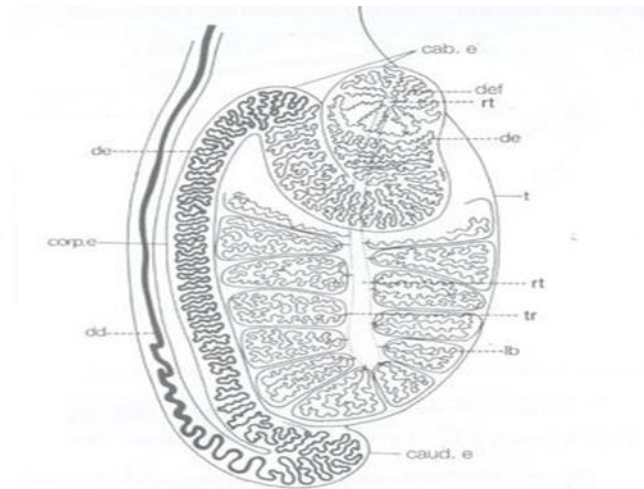


FIGURA 1-2. Representação esquemática do sistema tubular dos testículos e do epidídimo no touro (para simplificar, o sistema ductal da rete testis foi omitido). cab. e, cabeça do epidídimo; caud. e, cauda do epidídimo; corp. e, corpo do epidídimo; dd, ducto do epidídimo; def, ductulo deferente; lb, lóbulo com túbulos seminíferos; rt, rete testis; tr, túbulo reto; t, testículo. (Simplificado de Blom e Christensen. Nord Vet Med 1968;

Figura I: Representação esquemática do sistema tubular dos testículos e epidídimo do bode. Fonte: Hafez e Hafez, 2004

4.4. Colheita de espermatozóides do epidídimo

A colheita de espermatozóides do epidídimo pode representar a última oportunidade para garantir a preservação do material genético após a morte ou lesão grave do reprodutor. Essa técnica é especialmente valiosa em situações imprevisíveis, como óbitos súbitos ou intervenções cirúrgicas emergenciais que impeçam a coleta seminal convencional (Diaw, 2025).

Segundo Monteiro (2009), esta técnica permite o aproveitamento do material genético de reprodutores de elevado valor zootécnico bem como em estudos científicos sobre criopreservação, viabilidade *post-mortem* e morfologia espermática.

Estudos de Iranpour e Valojerdi (2013) demonstram que os espermatozóides coletados de epidídimo podem ser empregues com sucesso em técnicas de reprodução assistida, como a IA, a fertilização in vitro (IFV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI).

O uso de espermatozóides epididimário apresenta vantagens, nomeadamente: i) permite recuperar o material genético de reprodutores valiosos após a morte do

animal ou em casos de incapacidade reprodutiva; ii) possibilita o uso em IA, FIV e criopreservação de gametas; iii) é uma ferramenta importante na conservação de espécies ameaçadas e em bancos de gametas (Kaabi, et al., 2003). No entanto, há limitações a considerar: i) os espermatozoides epididimários embora morfológicamente maduros, ainda não passaram pelo processo de capacitação espermática promovido pelas secreções das glândulas acessórias, podendo apresentar menor motilidade e fertilidade *in vivo*; ii) a viabilidade espermática depende fortemente do tempo decorrido entre o abate e a recuperação, bem como da temperatura de armazenamento; iii) a variabilidade entre indivíduos e as condições de manipulação também afetam a qualidade final do sêmen (Silva *et al.*, 1993; Kaabi *et al.*, 2003; Sullivan e Mieusset, 2016).

4.4.1. Métodos de colheita de espermatozoides na cauda do epidídimo

O principal objectivo da obtenção de espermatozoides viáveis na cauda do epidídimo é a sua utilização em técnicas de reprodução assistida, como IA, FVI, criopreservação (Papa *et al.*, 2008; Heise *et al.*, 2010) e a ICSI (Herrera *et al.*, 2006), essas técnicas são usadas especialmente em casos de machos inférteis, sub-férteis ou recém-abatidos. Dentre os principais métodos de recuperação espermática destacam-se:

- I. **Flutuação (swim-out):** baseia-se na difusão passiva dos espermatozoides para um meio líquido. Neste método o epidídimo é cuidadosamente separado do testículo, faz-se várias incisões para expor os espermatozoides ao meio externo, posteriormente manter a cauda do epidídimo no meio. Após um período de incubação, o fluido resultante, rico em espermatozoides, é recolhido e submetido às avaliações. Este método é considerado simples, de fácil execução e não requer equipamentos sofisticados, embora possa resultar em maior contaminação por detritos celulares e menor rendimento espermático, ainda assim, é amplamente utilizado em estudos experimentais e em situações de campo (Martinez-Pastor *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2008).
- II. **Fluxo retrógrado da cauda do epidídimo:** relatada por Granemann (2006a), consiste na separação do complexo testículo-epidídimo, seguida pela remoção dos tecidos que envolvem o epidídimo a partir da dissecação do tecido conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo. Após desfazer os contornos do ducto epididimário, este deve ser cortado em três partes para

facilitar a lavagem, introduzir a solução fisiológica ou um meio diluidor no ducto deferente, assim os espermatozóides armazenados na cauda do epidídimo são exteriorizados, permitindo a sua recolha de forma mais limpa e homogênea. Este método possui a vantagem de proporcionar amostras com menor contaminação por contaminação por sangue e resíduos teciduais, além de permitir a recuperação de uma quantidade significativa. Cavalcante (2019) destaca que esta abordagem preserva a estrutura do epidídimo e possibilita alta taxa de recuperação espermática com a viabilidade adequada para procedimentos de conservação e uso reprodutivo.

- III. **Método de incisão:** baseada na libertação directa do conteúdo espermático por meio de cortes no tecido epididimario. Neste método a cauda do epidídimo é isolada assepticamente do testículo e várias incisões longitudinais (6-8) são feitas na superfície ventral da cauda do epidídimo e pressão manual para expor os espermatozóides ao ambiente externo (Lone *et al.*, 2011). O método é relativamente simples e eficaz, proporcionando boa recuperação espermática, porem pode resultar em maior contaminação por sangue e fragmentos teciduais, exigindo maior cuidado na manipulação e, por vezes, etapas adicionais de filtração do material colhido (Martins *et al.*, 2008).
- IV. **Método de fatiamento:** neste método, após a separação do epidídimo do testículo, a região da cauda é cortada em pequenos fragmentos ou fatias com o auxílio do bisturi. Os fragmentos são colocados em repouso, imersos em um meio diluente por 10 minutos. Após este período, o sobrenadante, rico em espermatozóides, é recolhido para avaliação. Este método tende a apresentar contaminação por sangue, células epiteliais e detritos teciduais, o que pode interferir na qualidade do material obtido quando comparado a métodos menos invasivos, como o fluxo retrógado. (Passamani *et al.*, 2021).

Estes métodos que são adaptadas conforme a espécie animal e as condições clínicas específicas, visando a obtenção de espermatozóides viáveis para uso em programas de reprodução assistida.

4.5. Qualidade dos espermatozóides epididimário

A avaliação das amostras seminais representa uma componente indispensável para o sucesso dos programas de reprodução animal (Silvestre, *et al.*, 2023). Este procedimento é essencial na reprodução animal, pois fornece informações sobre a capacidade fecundante dos espermatozóides e a integridade funcional das células germinativas. Esses parâmetros são fundamentais para determinar o potencial reprodutivo do reprodutor e a eficiência de técnicas como IA, criopreservação e FIV (Martins *et al.*, 2008).

A qualidade espermática refere-se à integridade da estrutura espermática, determinada pela motilidade progressiva, morfologia espermática, pH do sêmen e número de espermatozóides. Esta qualidade reflete o estado funcional do epitélio seminífero do testículo e as funções de maturação, transporte e armazenamento do epidídimo (WHO, 2021).

O ejaculado, em pequenos ruminantes, para ser considerado normal ele deve apresentar algumas características, tais como: cor pérola ou marfim, volume do ejaculado variando de 1,2 ml a 1,6 ml e concentração espermática de 2 a 5 milhões de espermatozóides/mL e espermatozóides móveis entre 68% e 85% (Sousa *et al.*, 2003).

4.6. Métodos de avaliação da qualidade do espermatozoides

A avaliação da qualidade do espermatozóide constitui uma etapa essencial na caracterização do potencial reprodutivo, permitindo identificar alterações que possam comprometer a fertilidade. Esta análise envolve a aplicação de diferentes metodologias que possibilitam examinar parâmetros físicos, morfológicos e funcionais, fornecendo informações sobre a integridade e a viabilidade espermática (Arruda *et al.*, 2004; Arruda *et al.*, 2011). Os métodos utilizados para esta finalidade são:

- I. **Motilidade massal:** consiste na avaliação colectiva do movimento dos espermatozóides presentes em uma amostra de sêmen fresco, este movimento é classificado em cruzes variando de uma a quatro cruzes. Quando o movimento é intenso, com ondas numerosas e rápidas por todo o campo, a motilidade é classificada em quatro cruzes (++++), movimentos

de menor intensidade correspondem a três cruces (+++), quando as ondas são menos evidentes e mais lentas, atribui-se duas cruces (++), movimentos fracos e com poucas ondas, são classificados como uma cruz (+), amostras com motilidade massal igual ou superior a três são consideradas excelentes. Para tal, colocou-se uma gota de sémen fresco numa lâmina, e observa-se a intensidade dos movimentos espermáticos ao microscópico, na ampliação 40x (Hafez e Hafez, 2004; Hoek *et al.*, 2022).

- II. **Mobilidade individual:** avalia a percentagem dos espermatozóides móveis e o tipo de movimento, para tal, deposita-se uma gota de sémen numa lâmina, adiciona-se uma gota de soro fisiológico, com o objectivo de reduzir a concentração espermática e permitir melhor visualização dos movimentos. A lâmina é coberta com lamela e observada ao microscópio, com ampliação 40X, adiciona-se óleo de imersão. A classificação desta motilidade é expressa em diferentes níveis de qualidade, de acordo com a percentagem de espermatozóides móveis. Considera-se excelente quando mais de 80% das células apresentam movimento rápido e progressivo; considera-se boa entre 79 até 60%, entre 59 a 40% considera-se regular; abaixo disso é considerado péssimo (Fonseca *et al.*, 2002).
- III. **Prova de supravitais:** também conhecida por teste de integridade da membrana plasmática, utiliza corantes que diferenciam espermatozóides vivos e mortos, como eosina-nigrosina ou eosina azul de bromofenol. As células vivas mantêm a membrana íntegra e não se coram, pois impedem a penetração de eosina, enquanto as mortas absorvem o corante, permitindo o cálculo da viabilidade percentual. Para a realização do teste, adiciona-se uma gota de sémen fresco na lâmina, uma de eosina 5% e duas de negrosina 10%, homogeneizar, fazer-se um esfregaço, após a secagem ao ar, as lâminas são observadas ao microscópio, com ampliação 100X. Na leitura, os espermatozóides vivos permanecem transparentes ou esbranquiçados, e espermatozóides mortos, aparecem coradas a rosa. O resultado é expresso em percentagem de espermatozóides vivos e mortos, sendo considerada excelente quando superior a 80%, boa entre 60 á 80%, regular entre 40 á 59%, má entre 20 á 39%, abaixo de 20% é considerada péssima (Hafez e Hafez, 2004).

- IV. **Avaliação morfológica:** realizada por microscopia ótica ou de contraste, identifica anomalias de cabeça, peça intermediária e cauda, que podem comprometer a motilidade e a fertilização.
- V. **Testes funcionais:** avaliam propriedades bioquímicas e fisiológicas, como teste hiposmótico (integridade da membrana plasmática), teste de capacitação e reação acrossômica, e atividade mitocondrial. Esses testes fornecem uma visão mais detalhada da capacidade funcional do espermatozóide.

Com o avanço tecnológico, técnicas mais precisas como CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) e citometria de fluxo vêm sendo empregues para análises automatizadas e quantitativas, aumentando a confiabilidade dos resultados (Arruda *et al.*, 2003)

É importante salientar que, nenhuma técnica de avaliação realizada isoladamente apresenta sensibilidade suficiente para a determinação da fertilidade, a combinação de diversos métodos tem agregado maior precisão para a estimativa do potencial de fecundação das amostras de sémen congelado (Freitas-Dell'Aqua *et al.*, 2011).

4.7. Factores que afectam a integridade da membrana e o potencial fertilizante

Segundo Arruda e colaboradores (2011), a integridade da membrana plasmática é um dos principais determinantes da viabilidade e fertilidade espermática. Essa estrutura é sensível a diversos factores físicos, químicos e biológicos, que podem comprometer sua função de barreira e troca iónica. Entre os principais factores que afectam a qualidade e o potencial fertilizante destacam-se: i) temperatura, o aumento da temperatura ou longos períodos de exposição após a colecta reduzem a motilidade e viabilidade celular; ii) processos de refrigeração, o congelamento-descongelamento pode causar lesões oxidativas e rutura de membranas, afectando a motilidade e a integridade do acrossoma; iii) pH e osmolaridade do diluidor, soluções inadequadas podem causar choque osmótico e desidratação celular; iv) contaminação bacteriana ou química, interfere no metabolismo espermático e promove a produção de radicais livres, levando à peroxidação lipídica.

4.8. Alterações fisiológicas após a morte do animal

Após morte do animal desencadeia uma série de modificações fisiológicas e bioquímicas nos tecidos testiculares e epididimários, que afectam directamente a viabilidade dos espermatozóides. Com a interrupção do fluxo sanguíneo, há cessação do fornecimento de oxigênio e nutrientes, estabelecendo um estado de isquémia e hipóxia (Martinez-Pastor *et al.*, 2005). De acordo com o mesmo autor, essa condição leva à redução do metabolismo celular e ao acúmulo de metabólitos tóxicos, como o ácido láctico, resultando em acidificação do meio intra e extracelular, o que desestabiliza as membranas plasmáticas e acrossomais das células espermáticas.

Além dessas alterações metabólicas, ocorre aumento da produção de radicais livres e intensificação do estresse oxidativo, que comprometem a integridade estrutural e funcional das organelas espermáticas (Strand *et al.*, 2017). A fragmentação da cromatina e o dano oxidativo ao DNA são consequências directas desses processos, podendo afectar a taxa de fertilização e o desenvolvimento embrionário (Costa *et al.*, 2010).

A magnitude dessas alterações depende do tempo decorrido após a morte, da temperatura ambiente, das condições de armazenamento e até mesmo da causa do abate (Langlait, 2014). Por esse motivo, o conhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos na degradação pós-morte é fundamental para definir estratégias de preservação da integridade espermática e otimizar o aproveitamento dos gâmetas em biotecnologias reprodutivas.

Essas alterações tornam o tempo decorrido entre o abate e a recuperação um factor crítico, sendo imprescindível a refrigeração imediata dos testículos para retardar o metabolismo e preservar a integridade celular por mais tempo (Kaabi *et al.*, 2003; Martinez-Pastor *et al.*, 2006)

4.9. Efeito do tempo após o abate na viabilidade dos espermatozóides epididimários

De acordo com Arruda e colaboradores (2011) o intervalo de tempo entre o abate do animal e a recuperação dos espermatozóides epididimários constitui um dos principais factores determinantes para a preservação da viabilidade e da

funcionalidade espermática. Logo após o abate, a cessação dos mecanismos fisiológicos de regulação testicular e epididimária torna os espermatozóides altamente sensíveis às condições externas. Assim, o tempo decorrido até a colheita influencia directamente a motilidade, a integridade de membrana e o potencial fertilizante das células espermáticas.

Estudos de Kaabi e colaboradores (2003) demonstra que períodos prolongados entre o abate e a colheita resultam em decréscimo acentuado da motilidade progressiva, além de redução na viabilidade celular, devido ao avanço dos processos autolíticos e oxidativos. Por essa razão, a recuperação deve ser efetuada o mais rapidamente possível após o abate, preferencialmente mediante o resfriamento imediato dos testículos entre 4 °C e 5 °C, o que permite retardar o metabolismo celular e preservar a integridade espermática por até 24 horas (Martinez-Pastor *et al.*, 2006).

Arruda, ainda destaca que, o controlo rigoroso do tempo e da temperatura pós-abate é, essencial para evitar alterações metabólicas e oxidativas que comprometem a qualidade seminal. A refrigeração imediata e o armazenamento adequado dos testículos são estratégias eficazes para garantir a conservação da matéria seminal, especialmente quando esta se destina à criopreservação ou utilização em biotecnologias da reprodução.

4.10. Conservação de espermatozóides epididimários por refrigeração

A conservação por refrigeração consiste em manter os espermatozóides epididimários à temperaturas reduzidas, geralmente entre 4 °C e 5 °C, com o objectivo de diminuir a taxa metabólica e o consumo de energia, retardando os processos degenerativos pós-morte (Mota-Filho e Silva, 2012).

Segundo Bustani e Baiee (2021), essa técnica é amplamente utilizada em situações nas quais a utilização do sémen ocorre em curto ou médio período, geralmente até 24 ou 48 horas após a colheita. Bergstein-Galan (2016) verificou que a refrigeração de espermatozóides epididimários ovinos a 5°C mantém a motilidade total até 24 h, mas após 48 h ocorre uma redução significativa, indicando comprometimento da qualidade espermática.

Assim, a refrigeração representa uma alternativa viável para transporte e uso imediato do sémen epididimário, especialmente em locais distantes dos centros de processamento seminal. Esta exerce efeito benéfico sobre diversos parâmetros

da qualidade espermática, principalmente na motilidade, uma vez que promove a redução da taxa metabólica dos espermatozoides. Essa diminuição do metabolismo celular contribui para preservação da viabilidade por períodos mais prolongados, sendo uma estratégia eficaz para a conservação temporária do sêmen em programas de reprodução assistida (Almeida *et al.*, 2023).

4.11. Aplicação de espermatozóide epididimário em IA, FIV e ICSI

As biotecnologias reprodutivas possibilitam conservar o potencial genético de indivíduos superiores e assegurar a continuidade de características desejáveis nas populações animais. Os bancos de germoplasma animal constituem um componente estratégico dos programas de conservação e melhoramento genético. Nesses bancos o material é colectado, avaliado e armazenado sob condições controladas, preservando sua viabilidade por longos períodos (Castelo, 2008).

Nos programas de melhoramento genético, a aplicação dessas biotecnologias é essencial para garantir a disponibilidade do material genético, mesmo após a morte do doador (Garcia-Alvarez *et al.*, 2009). Essa estratégia reduz a perda dos genótipos valiosos e amplia a base genética populacional, favorecendo o aumento da variabilidade e o controle mais eficiente das características produtivas de interesse zootécnico (Monteiro *et al.*, 2009).

Entre as aplicações mais relevantes dessas biotecnologias destaca-se o uso dos espermatozoides recuperados da cauda do epidídimo em técnicas como a IA, FIV e ICSI. Essas práticas permitem o aproveitamento do material genético de machos de alto valor zootécnico, mesmo após o abate ou a morte, garantindo a continuidade do seu potencial reprodutivo e contribuindo para a conservação de genótipos superiores.

4.12. Sucesso reprodutivo em IA e FIV com espermatozóides epididimários

Papa *et al.* (2008) avaliaram a criopreservação do espermatozóides epididimário em equinos usando o diluente Botu-Crio®. Das 18 éguas inseminadas, 12 (66%) estavam gestantes após 15 dias. Essa taxa de concepção foi superior a observada em estudos anteriores com sêmen fresco ou congelado (Bensdorp, 2005).

Em um estudo conduzido por Herrera *et al.*, (2006) foi avaliada a eficiência do sémen proveniente da cauda do epidídimo, previamente congelado, na técnica de ICSI, foram utilizados oócitos de equinos maturados *in vitro*, foram comparados 3 tipo de amostras espermáticas: sémen epididimário congelado, sémen ejaculado fresco e sémen ejaculado congelado. Os resultados demonstraram que os espermatozóides obtidos da cauda do epidídimo e posteriormente congelados apresentaram capacidade semelhante de gerar embriões em relação ao sémen fresco coletado por ejaculação.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local de estudo

As amostras para este estudo, foram obtidas no mercado informal de Xiquelene e o seu processamento foi feito no Laboratório de Reprodução Animal, na Faculdade de Veterinária.

5.2. Amostragem e critérios de inclusão

Foram utilizados testículos junto com os respectivos epidídimos de 10 animais, porém 2 pares foram utilizados para o aprimoramento da técnica e 1 apresentava uma patologia. Os bodes adquiridos eram de diferentes raças e idades estimadas entre um a três anos, sexualmente maduros e aparentemente saudáveis. A amostragem foi por conveniência devido dificuldades de acesso de animais pois há inexistência de matadouros oficiais para caprinos em Maputo.

5.3. Colheita e transporte dos testículos

Após o abate foi feita a orquidectomia, de seguida os testículos com os epidídimos foram imediatamente colocados em sacos plásticos, armazenados em uma caixa de isopor mantidos com gelo para preservar a integridade espermática, e transportados ao laboratório de reprodução animal num intervalo de 30 minutos (Benitez *et al.*, 2017).



Figura II: Transporte dos testículos na caixa de isopor (Fonte: arquivo pessoal)

5.4. Recuperação dos espermatozóides no epidídimo

Uma vez no laboratório, as amostras foram retiradas da caixa, de seguida separou-se o complexo testículo-epidídimo onde foi retirada a pele e o tecido

conjuntivo que recobre a cauda do epidídimo, por dissecação, de forma cuidadosa para evitar o rompimento dos vasos sanguíneos e do ducto epididimário (Granemann *et al*, 2006a).



Figura III: Bolsa escrotal com testículos (Fonte: arquivo pessoal)



Figura IV: Complexo testículo-epidídimo (Fonte: arquivo pessoal)



Figura V: Cauda do epidídimo isolada do testículo (Fonte: arquivo pessoal)

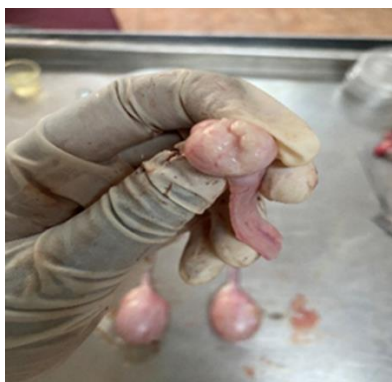


Figura VI: Cauda do epidídimo com incisão (Fonte: arquivo pessoal)

Para a recuperação do espermatozóide adoptou-se o procedimento conduzido Lone *et al.* (2011) e com modificações que consiste em 3 a 4 incisões longitudinais na parte vertical, usando bisturi estéril, em seguida pressionar manualmente de modo que o sémen se exteriorizem e colocou-se diretamente em uma lamela para observação no microscópio. Todo material usado foi pré-aquecido na platina térmica a 37°C.



Figura VII: Material na platina térmica (Fonte: arquivo pessoal)

6. RESULTADOS

Neste estudo, foi possível recuperar espermatozóides viáveis da cauda do epidídimo de bodes até 5 horas de tempo após abate.

A motilidade massal nas primeiras duas horas foi de 4 cruzes, indicando excelente vigor espermático. Esse padrão manteve-se até a hora 3, permanecendo com 4 cruzes. A partir da hora 5, verificou-se uma queda para 3 cruzes, evidenciando início de perda de qualidade. Na hora 7, a motilidade massal reduziu para 1 cruz, demonstrando comprometimento significativo da viabilidade espermática.

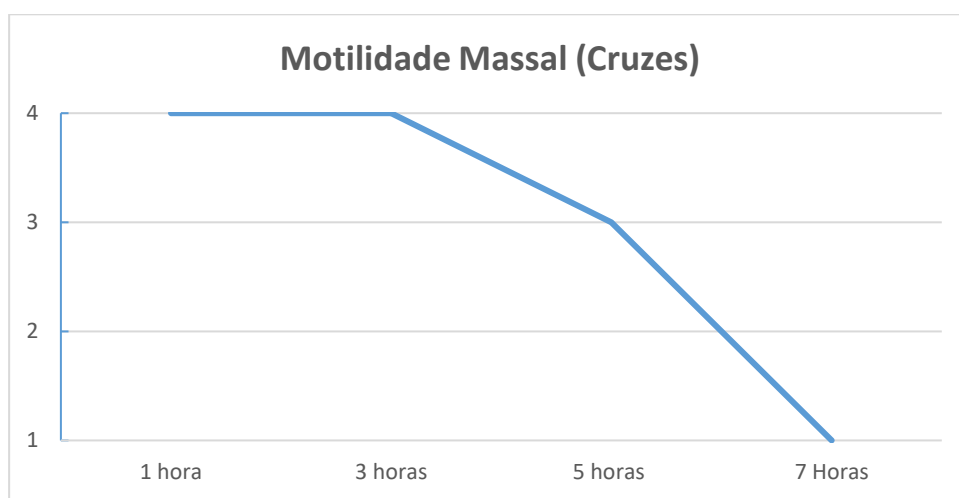


Gráfico I: Resultado da motilidade massal.

Motilidade progressiva, nas primeiras 2 horas, apresentou uma média de 95%, confirmando alta viabilidade celular, na hora 3, manteve-se elevada, com 80% de motilidade. Contudo, a partir da hora 5, ocorreu um declínio acentuado, com redução para 60%. Na hora 7, a motilidade individual caiu para apenas 30%, caracterizando redução do potencial de fertilidade.

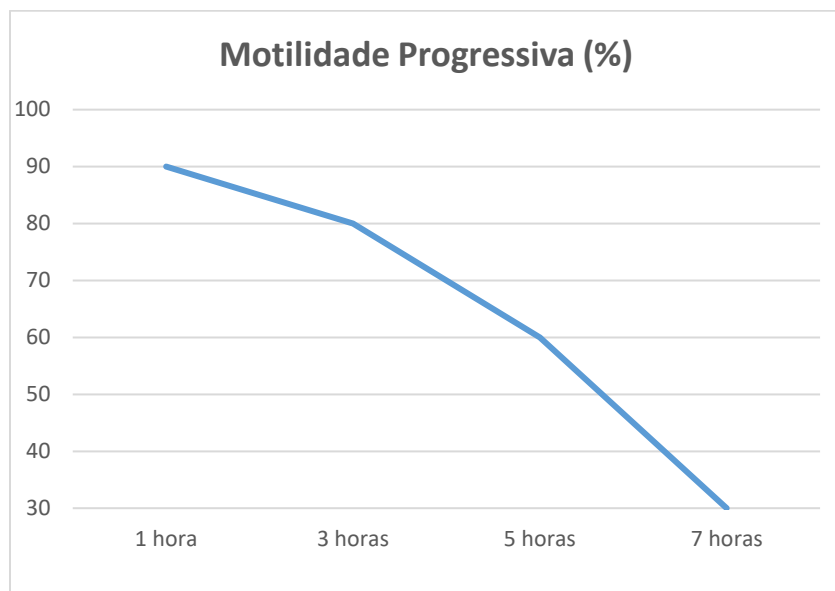


Gráfico II: Resultado da motilidade progressiva.

A análise de supravitais revelou 80% de espermatozóides vivos e 20% mortos, indicando boa viabilidade até a hora 1. Na hora 3 a proporção de células viáveis manteve-se inalterada em relação à primeira hora, sugerindo estabilidade. Observou-se na hora 5 uma redução da viabilidade, com 56% de espermatozóides vivos e 44% mortos, indicando início do comprometimento da integridade da membrana plasmática. Na hora 7, houve um declínio, restando apenas 10% de células vivas contra 90% de mortas, confirmando perda significativa da qualidade espermática neste período.

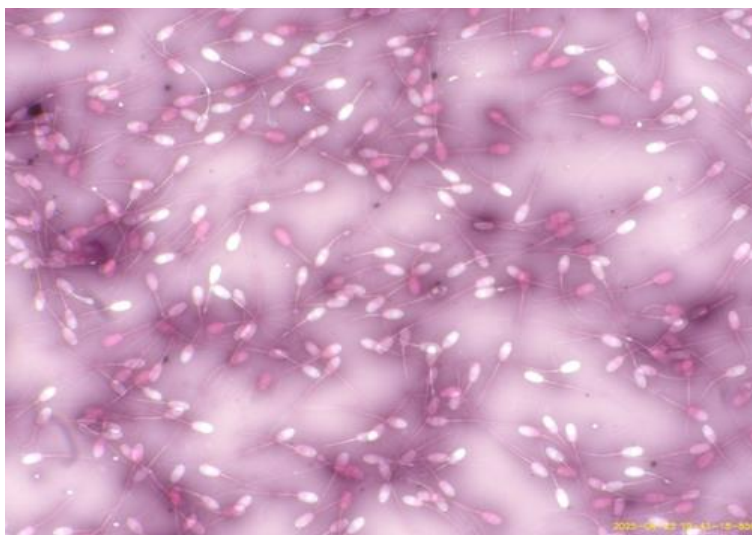


Figura VIII: Espermatozóides corados com eosina-negrosina, 1 horas pós abate
(Fonte: arquivo pessoal)

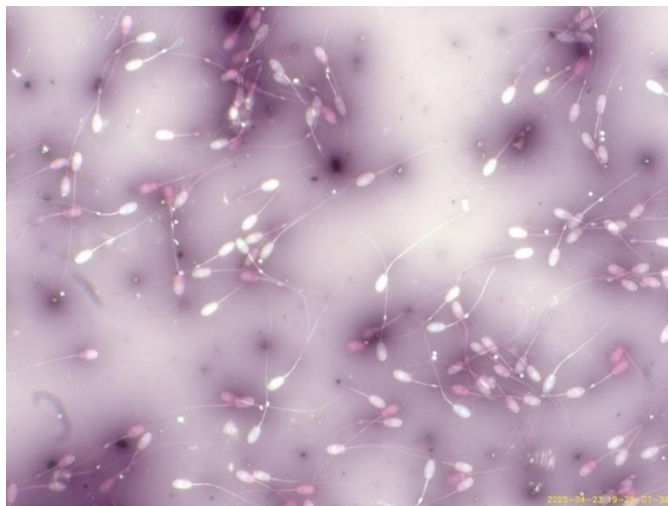


Figura IX: Espermatozóides corados com eosina-negrosina, 5 horas pós-abate
(Fonte: arquivo pessoal)

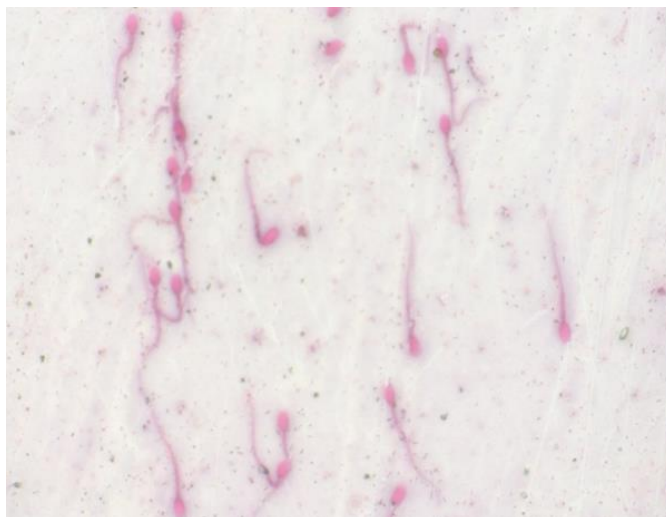


Figura X: Espermatozóides corados com eosina-negrosina, após 7 horas pós-abate. (Fonte: arquivo pessoal)

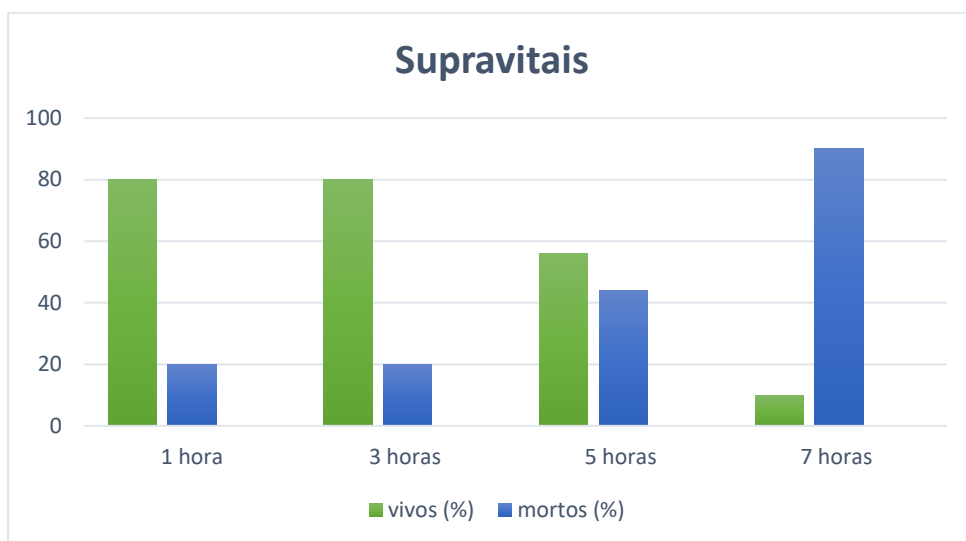


Gráfico III: Resultados de supravitais.

Tabela I: Resultados da motilidade massal, individual e supravitais em diferentes horas após o abate

Tempo de abate	Motilidade massal (cruzes)	Motilidade Progressiva	Supravitais
1 hora	++++	90	80% vivos e 20% mortos.
3 horas	++++	80	80% vivos e 20% mortos
5 horas	+++	60	56 vivos e 44 % mortos
7 horas	+	30	10% vivos e 90% mortos

7. DISCUSSÃO

A motilidade massal apresentou queda progressiva ao longo do tempo pós-abate, com redução evidente a partir da hora 5 e colapso quase total após 7 horas. Esse padrão é consistente com o comportamento típico de espermatozóides epididimários, cuja capacidade de movimento coletivo é extremamente sensível à interrupção do aporte energético e às alterações do microambiente epididimário. Os resultados estão de acordo com Martins *et al.* (2009) e Kaabi *et al.* (2003), esta similaridade pode se dever ao facto do processo de apoptose que afeta os espermatozóides no epidídimo pós-morte ser um mecanismo biológico semelhante entre mamíferos, especialmente em espécies filogeneticamente próximas. Os resultados obtidos neste estudo mostraram-se semelhantes aos relatados por outros autores que também conservaram os testículos por refrigeração em torno de 5°C, demonstrando que a temperatura é eficaz para retardar o metabolismo e preservar temporariamente a viabilidade espermática. No entanto, enquanto esses estudos mantiveram a motilidade por períodos mais longos, como observado por Monteiro *et al.* (2009), que registaram viabilidade por até 48 a 72 horas, o presente estudo apresentou uma redução mais precoce, essa discrepância provavelmente decorre do uso de gelo comum, que pode ter provocado flutuações de temperatura e um controle térmico menos estável em comparação aos sistemas de refrigeração controlada utilizados pelos outros autores, isto pode ter limitado a durabilidade observada neste trabalho.

A motilidade individual manteve-se elevada nas primeiras horas, com redução moderada até a hora 5, com 60%, e queda acentuada após esse período. Esse padrão sugere que, apesar da perda da coordenação coletiva, muitos espermatozóides ainda mantinham capacidade de movimento progressivo. Os valores observados até 5h são próximos aos relatados por Bumanlag *et al.* (2017), que encontraram motilidade individual de 78,5% (4h) e 64% (24h) em bodes submetidos a refrigeração a 5 °C. Também concordam com Mir *et al.* (2012), que relataram melhor desempenho quando a recuperação epididimária ocorreu nas primeiras 6 horas pós-abate. De forma crítica, os resultados indicam que a motilidade individual foi relativamente resiliente até a hora 5, reforçando que o resfriamento foi eficaz para preservar a função mitocondrial inicial, mas insuficiente para evitar o colapso energético subsequente.

A prova de supravitais demonstrou um declínio progressivo da viabilidade ao longo do tempo, com redução mais evidente a partir das 5 horas. Esse resultado indica que a perda funcional observada nas análises de motilidade ocorre paralelamente a degeneração estrutural das células espermáticas, envolvendo membranas, acrossoma e mitocôndrias. Acompanha a perda funcional observada nas análises de motilidade. Estudos prévios relatam que, mesmo sob refrigeração, a interrupção abrupta do metabolismo epididimário após a morte desencadeia processos de autólise celular que comprometem gradualmente a integridade da membrana e a viabilidade dos espermatozóides (Aisen et al., 2002; Kaabi et al., 2003; Martins et al., 2008). O declínio relativamente mais rápido observado no presente estudo, quando comparado a outros trabalhos, pode estar associado à espécie e à variabilidade individual, uma vez que espermatozóides de bodes podem apresentar padrões de resistência distintos daqueles descritos para bovinos, suínos ou felinos.

As diferenças observadas em relação a outros estudos também podem ser explicadas por factores metodológicos. No presente trabalho, a recuperação espermática foi realizada pelo método de incisão, técnica que tende a gerar amostras com maior contaminação por sangue e células somáticas, o que pode comprometer a motilidade e a viabilidade espermática (Martins et al., 2008). Além disso, a avaliação foi realizada por análise visual, método que pode subestimar a motilidade quando comparado a sistemas automatizados, como o CASA, capazes de detectar movimentos mínimos. A ausência de diluente durante o período de avaliação também pode ter contribuído para a menor durabilidade dos espermatozóides ao longo das horas pós-abate, uma vez que estudos demonstram que amostras não diluídas tendem a apresentar queda mais rápida da integridade da membrana quando comparadas a amostras diluídas (Kaabi et al., 2003; Bumalanga et al., 2017).

Desta forma, estes resultados sugerem que o uso de técnicas de avaliação e refrigeração simples representa uma alternativa eficaz e acessível para a preservação a curto prazo, especialmente em condições de campo ou laboratórios com infraestruturas limitadas. O padrão de declínio gradual observado em todas as amostras reforça a confiabilidade dos dados e demonstra que, mesmo com os recursos simples é possível obter bons índices de motilidade e viabilidade até 5 horas após a morte do animal. Esses achados são particularmente relevantes por

refletirem a realidade prática de países em desenvolvimento, como Moçambique, onde há limitações de infraestruturas laboratoriais. Assim, o presente estudo contribui com dados originais sobre espermatozóides de bodes testando um protocolo adaptado a realidade local.

8. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que os espermatozóides recuperados da cauda do epidídimo de bodes permanecem viáveis por até 5 horas, quando armazenados no gelo. Além disso, mostra-nos o potencial uso desses gametas em biotecnologias reprodutivas, mesmo após a morte do animal. No entanto, essa técnica ainda demanda mais estudos, com protocolos padronizados, claros e adaptáveis a realidade do campo, especialmente em situações onde a colheita do material ocorre em locais remotos ou sob condições básicas. O desenvolvimento de métodos simples e eficazes para a coleta e o manuseio pós-morte dos gametas pode ampliar significativamente as possibilidades de preservação genética na pecuária.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Aisen, E. G., Medina, V. H., Venturino, A. (2002). **Cryopreservation and post-trawed fertility of ram semen frozen in diferente trehalose concentrations.** Theriogenology, v. 57, n. 7, pp. 1801-1808.
- 2 Alcântara, L. M., Toniolli, R. (2024). **A espermatogênese.** *Ciência Animal.* v. 33, n. 4, pp. 101–121.
- 3 Almeida, J., Neves, B., Brito, M., Freitas, Robson. (2023). **Impact of in vitro fertilization by refrigerated vesus frozen buffalo semen on developmental competence of buffalo embryos,** *Animal Reproduction,* v. 17, n. 4.
- 4 Arruda R. P., Ball B. A., Gravance C. G, Liu I. K. M. (2003) **Determinação da integridade da membrana plasmática e acrossomal de espermatozóides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo.** *Acta Science Veterinary,* v.31, p. 226-227.
- 5 Arruda R. P., Celeghini E. C. C, Andrade A. F. C., Garcia A. R., Nascimento J., Raphael C. F., Souza L. W. (2004). **O Importância da qualidade do semen em programas de IATF e TETF.** *Iem Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada,* 1, 2004, Londrina, PR. Londrina, v.1, p. 166-179.
- 6 Arruda, R. P., Celeghini E. C. C., Alonso, M. A., Carvalho, L. Z., Oliveira, J., Nascimento, D. F., Silva, F. J., Affonso, K. M., Lemes, J. D. (2011). **Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento actual e desafios futuros,** *Revista Brasileira Reprodução Animal,* Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p.145-151.
- 7 Álvarez, M., Tamayo-Canul, J., Martínez-Rodríguez, C., López-Urueña, E., Gomes-Alves, S., Anel, L., Martínez-Pastor, F., de Paz, P. (2012). **Specificity of the extender used for freezing ram sperm depends on the spermatozoa source (ejaculate, electroejaculate or epididymis).** *Animal Reproduction Science,* v.132, n.3-4, p.145-154.
- 8 Amann, R. P., (2020) **A critical review of methods for evaluation of spermatogenesis from seminal characteristiscs.** *Journal of Andrology,* v. 2, n. 1, 37-58. (1981). Foi citado em: Daniel F. M. Silva, Fabio J. C. Faria, Fernando H. G. Furtado, Carlos A. C. Fernandes, Juliana C. B. Silva, Adriano Garcia, Deiler S. Costa., **Functional Morphology of the Spermatogenesis of Gir Bulls,** *Agricultural Sciences,* v. 11, n.11

- 9 Benitez, G. E., Chamba, H. O., Sanchez, E. S., Luzon, F. C., Sanchez, J. C. (2017). **Evaluacion comparativa dos metodos de recuperacion espermatica de epididimos bovinos *post-mortem***, Abanico Veterinario. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2018.81.6>
- 10 Bendsdorp, M. A., Cohlen, T. P. Cantineaua. (2005). **Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control**, Human, p. 2620-2624
Citado em: J. H., Lurie, D., Peymer, M., Katsoff, B. (1984). **Artificial donor insemination: fresh versus frozen semen; the patient as her own control. Fertility and Sterility**, v. 42. n. 2, p.293-295.
- 11 Bergstein- Galan, T. G. (2016). **Comparação de três métodos de refrigeração do sêmen ovino pelo período de 24 e 48 horas**. Archives of Veterinary Science, Curitiba, v. 21, n. 4, p. 1-8.
- 12 Bezerra, F. S. B. (2010). **Inseminação artificial em caprinos**. Acta Veterinaria Brasilia, v. 4, p. 131-136.
- 13 Bumanlag, A. C., Harada, L. M., Cynthia, C., Ocampo, M. B., Ocampo, L. C. (2017). **Sperm Motility assessment of epididymal sperm from *postmortem* goat testicles held at 5°C**, Entomology and Applied Science Letters, v. 4, n. 2, p. 16-18.
- 14 Bustani, G. S., Baiee, F. H. (2021). **Semen extenders: An evaluative overview of preservative mechanisms of semen and semem extenders**, Veterinary Word, v. 14, n. 5, p.1220-1233.
- 15 Castelo, T., Frota, T., Silva, A. (2008). **Considerações sobre a crio preservação do sêmen de caprinos**. Acta Veterinaria Brasil 2, p. 67-75
- 16 Cavalcante, A. S. (2019). **Recuperação e conservação de espermatozóides epididimários**. 99 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.
- 17 Chen, H., Wu. L., Guo, Y., Ma, Y. (2021). **DCXR is considered a marker of sperm maturation in humans. Andrologia**, v. 53, n.4, p. e13989.
- 18 Chongo, I. S. (2014). **Colheita e criopreservação de células espermáticas recuperadas da cauda do epidídimo de touros recém-abatidos**, Supervisor: Gracinda Mataveia, 636.082 (034) C545e MONOG ex.1Bib.2015.17, Trabalho de conclusão de curso (licenciatura em Medicina Veterinária) – Universidade Eduardo Mondlane
- 19 Cooper, T. G., Yeung, C. H. (2003). **Acquisition of sperm motility in the epididymis**. In R. H. Hunter (Ed.), Fertilization in the Mammalian Oviduct: Live Cell Imaging of Early Embryonic Development, pp. 211-223, Springer.

- 20 Costa, A., Lacerda, C., Freitas, F., (2010). **Criação de Ovinos e Caprinos em Campos Sales**, Ano IV - v. 2.
- 21 Courot, M., Hochereau de R. M. T., Ortavant, R. (1970a). **Mode of action testosterone on spermatogenesis. Annales de Biologie Animale Biochimie Biophysique**, v. 10, n. 1, p. 5-27.
- 22 Courot, M., Hochereau-de R. M.T., Ortavant, R. (1970b). **Spermatogenesis**: em: Johnson, A. D. Gomes, W. R., Vandermark, N. L. (Eds.). *The Testis*, New York: Academic Press, vol. 1, p. 339-432.
- 23 Dai, P., Zou, M. Cai, Z. Zeng, X. Zhang, X. Liang, M. (2024). **Ph Homeodynamics and Male Fertility**, Ed. Stanley M Hileman, Pubmed. <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11201807/>
- 24 Dellmann, H. D., Eurell, J. A. (2002). **O tratado de histologia veterinária**. 6. Ed. São Paulo: Roca.
- 25 Diaw, M., (2025). **Postmortem collection and cryopreservation of epididymal sperm.** **Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire** <https://chuv.umontreal.ca/english/equine-hospital-ressources/post/mortem-collection/>.
- 26 Fagundes, B., Tilburg, M. F., Caiado, J. R. C., Barreto, M. A. P., Silva, J. F. S. (2011). **Effect of addition of concentrated proteins and seminal plasma low molecular weight proteins in freezing and thawing of equine semen.** *Acta Biomedica Brasiliensia*, v. 2. n 1.
- 27 Fernandes, R., Carvajal, G., Kozlovski, N., Sullivan, R. (2021). **Epididymoses: Transfer of fertility-modulating proteins to the spermatozo.** *BMC, Biology*, v. 19, p. 78.
- 28 Fonseca, J. F. (2002). **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos.** Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Goiânia, GO. Anais Belo Horizonte, MG: CBRA, CD-ROM
- 29 França, L. R., Avelar, G., e Almeida, L. F. (2005). **Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pig.** *Theriogenology*, v. 63, n. 2, p. 300-318.
- 30 Freitas-Dell'Aqua, C. P., Crespilho, A. M., Papa, F. O., Dell'Aqua, Jr. (2011). **Metodologia de avaliação laboratorial do sêmen congelado bovino**, *Veterinary. Brasil Animal*, Belo Horizonte, v. 33, n. 4, p.231-222.

- 31 Gao, H., Li. W., Khawar, M. B. (2019). **Mechanism of Acrosome Biogenesis in Mammals. Frontier in Cell and Developmental Biology**, Lausanne, v. 7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6759486/>.
- 32 García-Alvarez, O., Maroto-Morales, A., Martínez-Pastor, F., Garde, J.J., Ramón, M., Fernández-Santos, M. R., Estes, M. C., Pérez-Guzmán, M. D., Soler, A. J. (2009). **Sperm characteristics and in vitro fertilization ability of thawed spermatozoa from Black Manchega ram: Electroejaculation and postmortem collection.** Theriogenology, v.72, n.2, p.160-168
- 33 Goyal, H. O., Memon, M. A. (2016). **Clinical Reproductive Anatomy and Physiology of the Buck, Veterian Key.** <https://veteriankey.com/clinical-reproductive-anatomy-and-physiology-of-the-buck/>
- 34 Granemann, L.C. (2006a). **Avaliação comparativa do sêmen eqüino colhido com vagina artificial e por lavado intraluminal da cauda do epidídimo pós orquiectomia.** 48f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.
- 35 Granemann, L.C; Weiss, R.R; Kozicki, L.E; Muradas, P.R.; Treml, T.E. (2006b). **Número total de espermatozóides de garanhões obtidos através da colheita com vagina artificial e por fluxo retrógrado da cauda de epidídimo,** Archives of Veterinary Science, v.11, n.1, p.73-77,
- 36 Gwazdauskas, F. C. (1985). **Effects of climate on reproduction in cattle,** Journal Dairy Science, v. 68, n. 6. p. 1568-1578. PMID: 3894448.
- 37 Hafez, E. S. E. (1970). **Reproduction and breeding techniques for laboratory animals.** Philadelphia: Lea & Febiger.
- 38 Hafez, E. S. E., Hafez, B. (2004). **Reprodução Animal.** 7. Ed. Barueri: Manole, pp. 66-72.
- 39 Heise, A., Siuda, M., Muller, K., Oldenhof, H., Petrunkina, A. M., Bicker, G. (2010) **Influence of seminal plasma on the quality of frozen-thawed stallion epididymal sperm.** Theriogenology, v. 73, n. 5, p. 606-613.
- 40 Herrera, C., Miragaya, H. M., Conde P., Hynes V., Losinno L., Quintans C. (2006). **Intracytoplasmic injection of vitro-matured equine oocytes with frozen-thawed epididymal sperm.** Animal Reproductive Science, 94:299-302
- 41 Herrera V. D., Castaño, E. M., Arcila, D. D., López, P. J., Mayorga-Torres, J. M., Cardona-Maya, W. D., e Cardona Cadavid, H. (2023). **Avaliação convencional e funcional do sêmen de caprinos leiteiros machos.** Estação Veterinária, v. 54, n. 2, pp. 129-136.

- 42 Hoek, M. V., Rickard, J. P., Graaf, S. P. (2022). **Motility Assessment of Ram Spermatozoa**, Developmental and Reproductive Biology, v. 11, n. 12.
- 43 Iranpour, F., Valojerdi, M. (2013). **The Epidymal sperm viability, motility and DNA integrity in dead mice maintained at 4-6°C**, Iranian Journal Reproductive Medicine, v. 11, n. 3, pp. 195-200.
- 44 Jones, R. (2004). **Sperm Survival Versus Degradation in the Mammalian Epididymis: A Hypothesis**. Biology of Reproduction, v. 71, n. 5, pp 1405–1411.
- 45 Junqueira, L.C., Carneiro, J. (2013). **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan
- 46 Kaabi, M., Paz, P., Alvarez, M., Anel, E., Baixo, B.C., Roiussi, H., Harraez, P., Anel, L. (2003). **Effect of epididymis handling conditions on the quality of ram spermarozoa recovered post-mortem**, Theriogenology, v. 60, pp. 1249-1259.
- 47 Lamglait, Benjamin. (2014). **Longevity of Sperm Cells Retrieved by Post-mortem Epididymal Aspiration in Wild Bovids in Zoo Conditions**, Research article, Reserve Africain de Sigean, 19 Chemin du Hameau du Lac, Rd 6009, 11130. <https://izar.org/izar/article/view/47/43>
- 48 Lavanya, M., Selvaraju, S., Krishnapa, B., Krishnaswamy, N., Nagarajan, G., e Kumar, H. (2021). **Microenvironmente of the male and femele reproductive tracts regulate sperm fertility: impact of viscosity, ph and osmolality**, Andrology, v. 10, n. 1, pp. 92-104.
- 49 Leal, M. C., Becker-Silva, S. C., Chiarini-Garcia, H., Franca, L. R. (2004). **Sertoli cell efficiency and daily sperm production in goats (Capra Hircus)**, Animal Reproduction, v. 1, p.122-128.
- 50 Lima, D.B.C., Silva, T.F.P., Aquino, C. A. (2016). **Recovery of sperm after epididymal refrigeration from domestic cats using ACP-117c and Tris extenders**. Arq. Brasil. Medical Veterinary Zootecnic., v.68, pp.873-881.
- 51 Lone, F. A., Islam, R., Khan, M. Z., e Sofi, K. A. (2011). **Effect of collection methods on the quality and quantity of spermatozoa recovered from the cauda epididymidis of slaughtered ram**. Indian Veterinary Journal, v. 88, n. 46.
- 52 Martinez-Pastor, F., Garcia-Macias, V., Alvarez, M. (2006). **Comparison of two methods for obtaining spermatozoa from the cauda epididymis of Iberian red deer**. Theriogenology, v.65, pp. 471-485.
- 53 Martins, C. F., Driessen, K., Costa, M. Melo., Carvalho, J. O. (2008). **Cryopreservation and fertilization potential of bovine spermatozoa obtained**

- from epididymides stored at 5 C by different periods of time, *Animal Reproductive Science*, PubMed, v. 116, n. 1-2, pp. 50-57.
- 54 Maxwell, W. M. C., Evans, G., El-Hajj, R., (2007). **Seminal plasma effect on sperm handling female fertility**. *Society Reproductive Fertility Suppl*, v. 64, pp. 13-38. PMID: 17491139.
- 55 Mieusset, R., Bujan, L. (1995). **Aquecimento testicular e suas possíveis contribuições para a infertilidade masculina: uma revisão**. *International Journal of Andrology*, v. 18, n. 3, p. 169-184.
- 56 Ministerio da Agricultura e Desenvolvimento Rural, *Inquérito Agrário Integrado 2020 | Marco Estatístico*, [MADER Inquerito Agrario 2020.pdf \(agricultura.gov.mz\)](https://mader.gov.mz/MADER/Inquerito_Agrario_2020.pdf)
- 57 Mir, S. S., Lone, F. A., Khan, M. Z., Malik, A. A., Islam, R., Sofi, K. A. (2012). **Effect of cold storage period on the quality of ram cauda epididymal spermatozoa recovered postmortem**, *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*: Vol. 36: No. 6, Article 16.
- 58 Monteiro, G. A., Guasti, P. N., Papa, F.O. (2009). **Colheita e preservação de células espermáticas de garanhões recuperadas da cauda do epidídimo**, *veterinária RVZ* v.16, n. 3, p. 448-458.
- 59 Moore, K. L., Persuad, T. V. N. (2008). **Embriologia Clínica**. 8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
- 60 Mota-Filho, A. C., Silva, L. D. da. (2012). **Recuperação e conservação de espermatozóides epididimários de mamíferos**. *Acta Veterinaria Brasilica*, v. 12, n.3, p. 152-158.
- 61 O'Donnell; Nicholson, H. D., Mclachlan, R. I. (2011). **Hormonal regulation of spermatogenesis**. Citado em: Plant, T. M., Zeleznick, A. J., (ed). **Knobil and Neil's Physiology of Reproduction**. 4 ed. New York: Elsevier, p. 1015 – 1068.
- 62 Papa, F. O., Melo, C. M., Fioratti, E. G., Della'Qua, J. A., Zahn F. S., Alvarenga, M. A., (2008). **Freezing of Stallion Epididymal Sper**. *Animal Reproduction Science*, v. 107, n.3-4, p. 293-301.
- 63 Park, Y., Lee, B., Pang, W., Ryu, D., Rahman, M., Pang, M. (2022). **Low Sperm Motility Is Determined by Abnormal Protein Modification During Epidymal Maturation**, *World Journal Means Health*, v. 40, n. 3, pp. 526-535.
- 64 Passamani, da C., Zanfrilli, dos S. A. P., Freitas, G. C. R., Tramontin, M. L. D., Rigoto, R. P., Dell'Aqua, C. P. F., Martins, M. I. M., Marques, A. B., Hidalgo, M. M. T., Sestari, D. A. O., Magalhas, R., Maziero, R. R. D. (2021). **Avaliação da congelabilidade dos**

- espermatozóides da cauda do epididimo. Bovina com adição de antioxidante.** Cartas criogénicas, v. 42, n. 2, p. 81-86.
- 65 Pereira, R., Sá, R., Barros, A., Sousa, M. (2015). **Major regulatory mechanisms involved in sperm motility.** Asian Journal of Andrology, v. 19, n. 1, pp. 5-14.
- 66 Rodriguez-Martinez, H., Roca, Jordi; Alvarez-Rodriguez, M., Martinez-Serrano, C. A. (2021). **How does the boar epididymis regulate the emission of fertile spermatozoa?** Animal Reproduction Science, v. 246, p. 106829.
- 67 Silva, A. E. D. F., Dode, M. A. N., Unanian, M. M. (1993). **Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e factores que influenciam.** Embrapa-CNOGC, Campo Grande
- 68 Silvestre, M. A., Soler, C., Mocé, E., Roldan, E. R. S., Yániz, J. L. (2023). **The importance of studying factors that affect the in Vitro evaluation of semen quality to predict potential fertility in males.** Biology (Basel), v.12, n.2, p. 235.
- 69 Sousa, W. H., Lobo, R., Morais, O. R. (2003). **Ovinos de Santa Ines: estado de arte e perspectivas**
- 70 Strand, J., K., Pedersen, H., Pertoldi, C. (2017). **Effects of post-mortem storage conditions of bovine epididymide characteristics: investigating a tool for preservation of sperm from endangered species,** Article in Conservation Physiology. <https://www.researchgate.net/publication/312027041>
- 71 Sullivan, R., e Mieusset, R. (2016). **the human epididymis: its functions in sperm maturation.** Human Reproduction Update. 22(5), 574-587.
- 72 Viadero, A. C. R., Dode, M. A. N., Silva, T. F. (2020). **Influence of testicular temperature on sperm production and quality in rams.** Thereiogenology, v. 148, pp. 27-34.
- 73 Wang, X., Yin, L., Wen., Yuan, S. (2022). **Mitochondrial regulation during male germ cell development.** Cellular and Molecular Life Sciences, v. 79, n. 2, p. 91.
- 74 World Health Organization. WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5 ed. Geneva: WHO, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item.9789240030787>