



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

YURI GONÇALVES MATOS

**ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA MATURAÇÃO ESPERMÁTICA DURANTE
O TRÂNSITO EPIDIDIMÁRIO NO RATO-DO-NARIZ-VERMELHO *Wiedomys
pyrrhorhinos* (Cricetidae: Sigmodontinae)**

MOSSORÓ

2026

YURI GONÇALVES MATOS

**ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA MATURAÇÃO ESPERMÁTICA DURANTE
O TRÂNSITO EPIDIDIMÁRIO NO RATO-DO-NARIZ-VERMELHO *Wiedomys
pyrrhorhinos* (Cricetidae: Sigmodontinae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia da Reprodução e Biotecnologia Animal

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr.

Coorientadora: Andreia Maria da Silva, Dra.

MOSSORÓ

2026

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

M425a Matos, Yuri Gonçalves.
Aspectos morfofuncionais da maturação
espermática durante o trânsito epididimário no
rato-do-nariz-vermelho *Wiedomys pyrrhorhinos*
(Cricetidae: Sigmodontinae) / Yuri Gonçalves
Matos. - 2026.
77 f. : il.

Orientador: Alexandre Rodrigues Silva.
Coorientadora: Andreia Maria Silva.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2026.

1. roedor. 2. Caatinga. 3. epidídimo. I. Silva,
Alexandre Rodrigues, orient. II. Silva, Andreia
Maria, co-orient. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

YURI GONÇALVES MATOS

**ASPECTOS MORFOFUNCIONAIS DA MATURAÇÃO ESPERMÁTICA DURANTE
O TRÂNSITO EPIDIDIMÁRIO NO RATO-DO-NARIZ-VERMELHO *Wiedomys
pyrrhorhinos* (Cricetidae: Sigmodontinae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia da Reprodução e Biotecnologia Animal

Defendida em: 24 / 02 / 2026.

BANCA EXAMINADORA

**Alexandre
Rodrigues Silva**

Assinado de forma digital por
Alexandre Rodrigues Silva
Dados: 2026.04.16 13:49:57
-03'00'

Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente

**Romário Parente
dos Santos**

Assinado de forma digital por
Romário Parente dos Santos
Dados: 2026.04.15 11:11:33 -03'00'

Romário Parente dos Santos, Dr. (UFERSA)
Membro Examinador



Documento assinado digitalmente
JANAINA TORRES CARREIRA
Data: 15/04/2026 10:59:02-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Janaina Torres Carreira, Dra. (Reneco International Wildlife Consultants)
Membro Examinador

AGRADECIMENTOS

Tecendo a Manhã

*Um galo sozinho não tece uma manhã:
ele precisará sempre de outros galos.
De um que apanhe esse grito que ele
e o lance a outro; de um outro galo
que apanhe o grito que um galo antes
e o lance a outro; e de outros galos
que com muitos outros galos se cruzem
os fios de sol de seus gritos de galo,
para que a manhã, desde uma teia tênue,
se vá tecendo, entre todos os galos.*

*E se encorpando em tela, entre todos,
se erguendo tenda, onde entrem todos,
se entretendendo para todos, no toldo
(a manhã) que plana livre de armação.
A manhã, toldo de um tecido tão aéreo
que, tecido, se eleva por si: luz balão.*

João Cabral de Melo Neto

In: Poesias Completas. Rio de Janeiro, José Olympio, 1979.

Este documento representa a materialização de uma trajetória acadêmica, mas entre todas as páginas e parágrafos escritos, nenhuma palavra pode descrever tudo que vivi até aqui. Em um parágrafo detalho a metodologia científica que foi aplicada no projeto de pesquisa, mas essa descrição é incapaz de traduzir o sentimento que preenche uma manhã de coletas, uma tarde de processamentos ou um dia de avaliações. Porque no artigo nós não descrevemos os cafés da tarde (ou café de qualquer hora, o importante era ter café), as conversas fiadas, os medos, as frustrações e desesperos, as alegrias e gargalhadas, nem é possível mencionar a quantidade desmoderada de calorias ingeridas em bolos e salgadinhos. Caminhar com professores e colegas extremamente qualificados certamente moldaram minha formação científica, mas a oportunidade de ter essa formação em um ambiente de acolhimento, respeito e valorização, me enriqueceram como ser humano. Por isso, agradeço imensamente à Ana Glória, Tayná, Romário, Constância, Luana, Andreia, Gabriel, Yasmim, e todos que fizeram e fazem parte da equipe do Laboratório de Conservação de Germoplasma Animal. Sou grato por essas pessoas, que mesmo tão diferentes, vindo de realidades tão distintas, compartilharam um interesse em comum e dividiram um mesmo propósito. Tudo foi construído em conjunto, e todos os momentos estarão guardados de uma forma muito especial na minha memória.

Em especial, agradeço àquele que me acolheu como orientando na Graduação e me acompanha desde então, Prof. Alexandre Rodrigues. É um privilégio ter como orientador um pesquisador plenamente reconhecido pela comunidade científica, mas é inspirador conhecer um profissional comprometido e genuinamente apaixonado pelo que faz. Sou imensamente grato pela confiança depositada em mim, que sempre veio acompanhada de desafios, mas era exatamente isso que me impulsionava a crescer e ir além do que eu imaginava ser capaz. Obrigado por mostrar que o rigor é importante para o crescimento profissional, mas que as relações se fortalecem ainda mais quando se forma pessoas com sensibilidade e humanidade.

À minha base. Minha mãe, Iraci Gonçalves; meu pai, Nonato Leite; meu irmão, Ítalo Gonçalves; minha avó, Dona Rosa; e meu avô, Seu Sebastião (*in memoriam*). Obrigado por todos os esforços dedicados pela minha educação. Carrego comigo a certeza de que nunca caminho sozinho. Todas as minhas conquistas são no plural, pois também são de vocês.

Ao meu companheiro de vida, Antônio Gustavo. Obrigado por caminhar ao meu lado, por ser abrigo nos dias difíceis, e celebrar comigo cada passo à frente. Seu amor e incentivo foram essenciais ao longo dessa jornada. Ao seu lado, os dias são melhores.

Agradeço à Universidade Federal Rural do Semi-Árido, que me acolheu durante oito anos e construiu a base de toda a minha formação como Médico Veterinário e, agora, Mestre. Obrigado por ter sido cenário de momentos marcantes, encontros, ensinamentos, conquistas e amadurecimento, que foram fundamentais para a minha formação acadêmica e pessoal.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da UFERSA, por toda a contribuição e ensinamentos durante essa trajetória.

Ao Prof. Moacir Franco de Oliveira, ao Dr. Radan Elvis e aos funcionários do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da UFERSA. Obrigado pela ajuda essencial para a execução deste projeto.

À banca examinadora, Dra. Janaína Torres Carreira e Dr. Romário Parente dos Santos. Obrigado pela disponibilidade e pelas contribuições.

À CAPES, pelo apoio financeiro através do fornecimento da bolsa de estudos.

Aos seres mais puros. Meu respeito e gratidão. É e será sempre. Pelos animais.

Muito obrigado!

RESUMO

O rato-do-nariz-vermelho (*Wiedomys pyrrhorhinos*) é um roedor sigmodoníneo típico da Caatinga, mas apesar da importância ecológica da espécie, o conhecimento sobre sua biologia reprodutiva permanece escasso. Diante disso, objetivou-se descrever as características morfofisiológicas dos espermatozoides durante o trânsito epididimário de ratos-do-nariz-vermelho criados em cativeiro. Para tanto, esta dissertação foi dividida em dois capítulos. No Capítulo I, objetivou-se caracterizar os parâmetros morfológicos e funcionais dos espermatozoides durante o trânsito epididimário na espécie. Foram utilizados sete machos adultos provenientes do Centro de Multiplicação de Animais Silvestres da UFERSA, e as amostras espermáticas foram recuperadas das regiões da cabeça, corpo e cauda do epidídimo pela técnica de *slicing*. Foi observado um aumento significativo ($P < 0.05$) na concentração espermática e integridade da cromatina ao longo do trânsito. A porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais também foi maior ($P < 0.05$) na cauda do epidídimo ($93.8 \pm 0.9\%$), e essas células foram observadas sob microscopia eletrônica de varredura, permitindo a caracterização ultrasestrutural como uma célula de cabeça oval e acrossomo em formato de gancho, padrão consistente com roedores filogeneticamente próximos. No Capítulo II, objetivou-se estabelecer a osmolaridade ideal para validar o Teste Hiposmótico e avaliar a integridade funcional da membrana plasmática durante a maturação espermática na espécie. Foram utilizados oito machos adultos para testar diferentes soluções hiposmóticas (0, 50 e 100 mOsm/L). Enquanto a motilidade e viabilidade não apresentaram diferenças significativas entre as regiões epididimárias ($P > 0.05$), o HOST revelou um aumento ($P < 0.05$) na reatividade osmótica durante a maturação. A solução de frutose a 50 mOsm/L mostrou-se mais eficaz, com $80.3 \pm 2.8\%$ de reatividade quando utilizada em espermatozoides recuperados da cauda. Além disso, uma forte correlação positiva ($\rho = 0.82$) foi observada entre a capacidade osmótica da membrana e a motilidade total. Em conclusão, estes achados fornecem, pela primeira vez, informações consistentes sobre a fisiologia reprodutiva de *W. pyrrhorhinos*, demonstrando que a maturação espermática na espécie envolve um aumento progressivo da integridade estrutural e competência funcional da célula espermática.

Palavras-chave: roedor, epidídimo, Caatinga.

ABSTRACT

The red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*) is a sigmodontine rodent typical of the Caatinga biome. However, despite its ecological importance, knowledge regarding its reproductive biology remains scarce. Therefore, the present study aimed to describe the morphophysiological characteristics of spermatozoa during epididymal transit in captive red-nosed-mouse. For this purpose, this dissertation was divided into two chapters. In Chapter I, the objective was to characterize the morphological and functional parameters of spermatozoa during epididymal transit in the species. Seven adult males from the Center of Wild Animals Multiplication of UFERSA were used, and sperm samples were recovered from the caput, corpus and cauda regions of the epididymis using slicing technique. A significant increase ($P<0.05$) in sperm concentration and chromatin integrity was observed throughout epididymal transit. The percentage of morphologically normal spermatozoa was also higher ($P<0.05$) in the cauda epididymis ($93.8\pm0.9\%$), and these cells were examined by scanning electron microscopy, allowing ultrastructural characterization as sperm cells with an oval head and hook-shaped acrosome, a pattern consistent with phylogenetically related rodents. In Chapter II, the objective was to establish the ideal osmolarity to validate the hypoosmotic swelling test (HOST) and to evaluate plasma membrane functional integrity during sperm maturation in the species. Eight adult males were used to test different hypoosmotic solutions (0, 50 and 100mOsm/L). While motility and viability did not show significant differences among epididymal regions ($P>0.05$), HOST revealed an increase ($P<0.05$) in osmotic responsiveness during maturation. The 50mOsm/L fructose solutions proved to be the most effective, with $80.3\pm2.8\%$ reactivity when applied to spermatozoa recovered from the cauda epididymis. In addition, a strong positive correlation ($\rho=0.82$) was observed between membrane osmotic capacity and total motility. In conclusion, these findings provide, for the first time, consistent information on the reproductive physiology of *W. pyrrhorhinos*, demonstrating that sperm maturation in this species involves a progressive increase in structural integrity and functional competence of the sperm cell.

Keywords: Caatinga, epididymis, rodent.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Rato-do-nariz-vermelho (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i>). Arquivo pessoal (2026)....	15
Figura 2	– Mapa de distribuição do rato-do-nariz-vermelho (<i>Wiedomys pyrrhorninos</i>). Fonte: Traduzido de: IUCN (2017).....	16
Figura 3	– Epidídimo de rato. A) Segmentação anatômica macroscópica do epidídimo de rato. B) Visão panorâmica de uma secção longitudinal do epidídimo de rato sob microscopia de luz, H&E. (1) Segmento inicial; (2) Cabeça; (3) Corpo; (4) Cauda. Fonte: Kempinas e Klinegelter (2014), Adaptado.....	18
Figura 4	– Representação esquemática dos tipos celulares e organização do epitélio epididimário como observado sob microscopia de luz. Fonte: Robaire <i>et al.</i> (2006), Traduzido.....	19
Figura 5	– Filogenia de roedores muroides com esboço da morfologia da cabeça dos espermatozoides de cada representante das famílias e subfamílias. Fonte: Breed <i>et al.</i> (2014).....	27

Capítulo I:

Figure 1	– A) Red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i>). B) Red-nosed-mouse testis-epididymis complexes.....	42
Figure 2	– Photomicroscopy of red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i>) epididymal sperm. A) Morphologically normal sperm; B) Folded tail; C) Coiled tail; D) Fusiform head; E) Detached acrosome.....	48
Figure 3	– Electron micrograph of sperm morphology of red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i>). A. Highlight the head of the spermatozoon, visualizing A – Acrosome; H – Head; N – spermatid Neck; and M – Midpiece. B. Epididymal spermatozoa of red-nosed-mouse with cytoplasmic droplets (CD) in SEM, also visualizing the Annulus (An) of the spermatozoon. C. Visualization of sperm segments, in H – Head; M – Midpiece; and T – Tail.....	49

Capítulo II:

Figure 1	– Mean ($\pm$ SE) of swollen spermatozoa (%) reactive to hypoosmotic solutions in each epididymal region.....	66
----------	--	----

LISTA DE TABELAS

Capítulo I:

Table 1	– Mean ($\pm$ SE) of sperm parameters from spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i> ; n=7).....	46
Table 2	– Mean ($\pm$ SE) of kinetic parameters of spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i> ; n=7).....	46
Table 3	– Mean ($\pm$ SE) of sperm morphology in spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i> ; n=7).....	47
Table 4	– Mean ($\pm$ SE) of morphometric parameters of spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i> ; n=7).....	48

Capítulo II:

Table 1	– Mean ($\pm$ SE) of sperm parameters from spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i> ; n=8).....	64
Table 2	– Mean ($\pm$ SE) of kinetic parameters of spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i> ; n=8).....	65
Table 3	– Correlation (ρ) between the osmotic response to different hypoosmotic solutions and sperm parameters from different epididymal regions of the red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i> ; n=8).....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IUCN	União Internacional para a Conservação da Natureza
CASA	Análise Computadorizada de Sêmen
VCL	Velocidade Curvilínea
VSL	Velocidade Linear Progressiva
VAP	Velocidade Média da Trajetória
ALH	Amplitude de Deslocamento Lateral da Cabeça
BCF	Frequência de Batimento Flagelar Cruzado
STR	Retilinearidade
LIN	Linearidade
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
IP	Iodeto de Propódio
H33342	Hoechst 33342
HOST	Teste Hiposmótico
CASMA	Análise Computadorizada de Morfometria Espermática
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
ANOVA	Análise de Variância
SE	Erro Padrão
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
CEUA	Comissão Ética no uso de Animais
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
CEMAS	Centro de Multiplicação de Animais Silvestres
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
NaCl	Cloreto de Sódio
HCl	Ácido Clorídrico
DPBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato de Dulbecco
MOT	Motilidade Total
MOP	Motilidade Progressiva
CPVSA	Centro de Pesquisas Vegetais do Semiárido
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
~	Aproximadamente
µm/s	Micrômetro por segundo
µm	Micrômetro
Hz	Hertz
10 ⁶	Milhões
±	Mais-menos
g	Grama
mL	Mililitro
®	Marca registrada
mg	Miligrama
kg	Quilograma
µL	Microlitro
mOsm	Miliosmol
L	Litro
M	Mol
µg	Micrograma

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	13
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1.	Aspectos bioecológicos do rato-do-nariz-vermelho (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i>). 15	
2.2.	Modificações morfofuncionais espermáticas durante o trânsito epididimário 17	
2.3.	Obtenção de espermatozoides epididimário.....	20
2.4.	Avaliação dos espermatozoides epididimários.....	22
2.4.1.	Parâmetros cinéticos e concentração espermática	22
2.4.2.	Integridade da cromatina espermática	23
2.4.3.	Integridade estrutural da membrana plasmática	23
2.4.4.	Integridade funcional da membrana plasmática	24
2.4.5.	Morfologia e morfometria espermática	25
2.4.6.	Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica	26
3.	JUSTIFICATIVA	28
4.	HIPÓTESES CIENTÍFICAS	29
5.	OBJETIVOS	29
5.1.	Objetivo geral.....	29
5.2.	Objetivos específicos.....	29
	REFERÊNCIAS	30
	CAPÍTULO I – Regional morphofunctional features of sperm maturation in the epididymis of the red-nosed mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i>).....	37
	CAPÍTULO II – Regional assessment of epididymal sperm membrane function using the Hypoosmotic Swelling Test in red-nosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i>).....	57
	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	74
	ANEXO A – Resumo publicado na 14ª Conferência Bienal 4A (Association For Applied Animal Andrology)	75
	ANEXO B – Resumo publicado na VIII Reunião Anual da ABRAA (Associação Brasileira de Andrologia Animal)	75
	ANEXO C – Comprovante de submissão no periódico <i>Reproduction, Fertility and Development</i> (FI: 1.8 / QUALIS A2)	76

1. INTRODUÇÃO

Em consequência da degradação ambiental acelerada, a mastofauna da Caatinga sofre constantes ameaças pela exploração, destruição de habitats e mudanças climáticas (Moura *et al.*, 2023). Como consequência, o declínio populacional, a migração de espécies e homogeneização dos habitats é uma realidade preocupante para pesquisadores que projetam cenários futuros de colapso nos ecossistemas (Moura *et al.*, 2023). Somado a esse contexto, a Caatinga é uma região notadamente negligenciada do ponto de vista científico, com escassez de informações consistentes sobre a ecologia e fisiologia dos seus pequenos mamíferos silvestres, o que resulta na carência de protocolos e políticas conservacionistas eficazes (Leal *et al.*, 2005).

Nesse cenário, o *Wiedomys pyrrhorhinos* (Wied-Neuwied, 1821) é um pequeno roedor cricetídeo, conhecido popularmente como rato-do-nariz-vermelho, rato-de-fava ou rato-bico-de-lacre, que está distribuído nas áreas semiáridas do Nordeste brasileiro ocupando a região da Caatinga (Cunha-Filho, 2019). Entretanto, a espécie apresenta alta sensibilidade aos diferentes padrões biogeográficos deste domínio morfoclimático, como diferentes formações vegetais, variações pluviométricas e disponibilidade de alimentos (Sobral e Oliveira, 2014). Somado à fragmentação do bioma, essa sensibilidade resulta em descontinuidades na distribuição populacional, fazendo com que a demografia da espécie possa ser utilizada como biomarcador de alterações ambientais e de qualidade do habitat (Cunha-Filho, 2019; Faria e Kaizer, 2020).

Ecologicamente, os pequenos mamíferos desempenham um papel fundamental nas dinâmicas ambientais, pela predação e dispersão de sementes, plântulas e fungos micorrízicos, além de manter o equilíbrio das cadeias tróficas como presas para diversos predadores (Mangan e Adler, 2000). No entanto, informações básicas sobre a biologia reprodutiva do gênero *Wiedomys* permanecem escassas, com ausência de dados sobre a morfologia, qualidade e funcionalidade dos gametas masculinos, o que limita o desenvolvimento de estratégias de conservação específicas para a espécie (Léon-Tapia e Cervantes, 2019).

A reprodução masculina envolve uma série de eventos complexos, desde a espermatogênese no epitélio seminífero testicular, até o trânsito epididimário e a ejaculação. Ao longo desse percurso, os espermatozoides passam por modificações estruturais, bioquímicas e funcionais, que resultam na aquisição progressiva de motilidade e capacidade fecundante (James *et al.*, 2020; Sulzyk *et al.*, 2025). Embora esses processos sejam amplamente descritos em roedores murinos utilizados como modelos experimentais (Robaire *et al.*, 2006), ainda são pouco aprofundados nos estudos da fisiologia reprodutiva de roedores silvestres. Por exemplo,

em cutias (*Dasyprocta spp.*), a caracterização inicial dos espermatozoides e das técnicas de coleta e avaliação espermática permitiu o avanço para a aplicação posterior de biotecnologias da reprodução mais avançadas, como a criopreservação espermática (Castelo *et al.*, 2023). Assim, o entendimento da fisiologia reprodutiva do rato-do-nariz-vermelho é essencial para subsidiar estratégias de manejo e conservação no futuro, e portanto este trabalho visa preencher essas lacunas, pela descrição das características morfofisiológicas de espermatozoides epididimários em *W. pyrrhorhinos*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos bioecológicos do rato-do-nariz-vermelho (*Wiedomys pyrrhorhinos*)

Entre a mastofauna da Caatinga, o rato-do-nariz-vermelho (*Wiedomys pyrrhorhinos*), também conhecido como rato-de-fava ou rato-bico-de-lacre, é um pequeno roedor da família Cricetidae, subfamília Sigmodontinae, de hábito escansorial para escalada nas superfícies verticais das florestas semi-arborícolas e rochosas que habita (Bocchieglieri *et al.*, 2012). A espécie é descrita como de porte pequeno, tendo sua cauda significativamente maior do que o comprimento do corpo. Em contraste à base de pêlos cinzentos ou castanho-escuro, possui a parte posterior do dorso, bem como a superfície externa da orelha e do focinho, alaranjados, o que caracteriza seu nome popular (Bonvício *et al.*, 2008) (Figura 1).



Figura 1. Rato-do-nariz-vermelho (*Wiedomys pyrrhorhinos*). Arquivo pessoal (2026).

É considerada uma espécie endêmica na Caatinga, e atualmente é listada como “Menos Preocupante” ao risco de extinção pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (Marinho Filho e Langguth, 2017), mas sua distribuição no bioma não é homogênea e a densidade populacional é sensível à variações ambientais, como formações vegetais, variações pluviométricas e disponibilidade de alimentos (Figura 2) (Sobral e Oliveira, 2014). Somado às particularidades no seu ciclo de vida, como curto período gestacional, reprodução e desmame precoces, grandes tamanhos de ninhadas altriciais e curto tempo de vida, as modificações na dinâmica populacional são rapidamente percebidas em resposta à sensibilidade para fatores externos, portanto esses aspectos demográficos de pequenos roedores podem servir como bioindicadores ecológicos de alterações do habitat (Faria e Kaizer, 2020). Nesse contexto, a fragmentação e a ameaça à conservação da Caatinga resulta em descontinuidades na distribuição geográfica e notáveis flutuações populacionais do rato-do-nariz-vermelho (Sobral e Oliveira, 2014; Cunha-Filho, 2019).

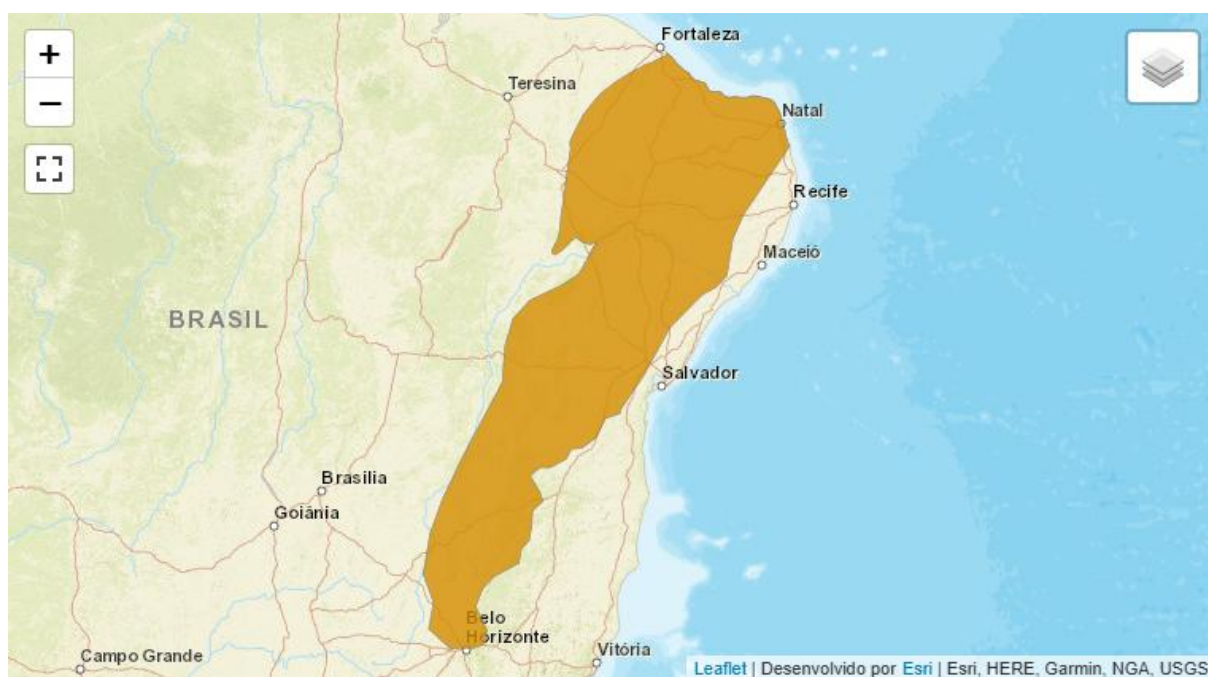


Figura 2. Mapa de distribuição do rato-do-nariz-vermelho (*Wiedomys pyrrhorninos*). Fonte: Traduzido de: IUCN (2017).

Moura *et al.* (2023) avaliam o prognóstico de populações de pequenos mamíferos em florestas tropicais secas, projetando os impactos dos distúrbios crônicos sofridos pela Caatinga nos últimos anos. Estes autores mostram que, consequente à superexploração e destruição dos habitats, as mudanças climáticas poderão gerar reduções significativas das áreas adequadas para ocupação e sobrevivência de até 87% dos mamíferos não-voadores no bioma. Ainda, as

espécies mais impactadas devem ser os pequenos mamíferos, entre eles os roedores do gênero *Wiedomys* (*W. pyrrhorhinos* e *W. cerradensis*), o que evidencia a necessidade de políticas conservacionistas para o bioma, mas também para as espécies que podem ser direta e indiretamente afetadas.

Em relação aos dados reprodutivos, a maturidade sexual na espécie acontece quando o terceiro molar alcança o plano oclusal. Em fêmeas, esse momento é detectado em média quando o indivíduo atinge 31 gramas de peso ou 9.74 centímetros de comprimento (Sobral e Oliveira, 2014). Eisenberg e Redford (1999) descrevem que as fêmeas de *W. pyrrhorhinos* começam a gestar a partir de 83 dias de idade. Esse padrão é semelhante aos machos, que apresentam vascularização testicular também à idade em que o terceiro molar superior atinge o plano oclusal, o que indicaria um mecanismo de termorregulação preparatório para a espermatogênese (Sobral e Oliveira, 2014).

Em estudo de Sobral e Oliveira (2014) na espécie, realizando captura de fêmeas prenhes durante o período de um ano, foi possível diagnosticar gestação durante todos os meses amostrados, embora uma maior frequência tenha sido observada ao final da estação chuvosa, considerando o período de gestação de sigmodontíneos entre 23 a 30 dias, e o tamanho da ninhada variando de 2 a 11 filhotes. No entanto, essa diferença não foi notável em relação a vascularização testicular de machos, que se manteve homogênea. De acordo com Bronson (1985), essa pode ser uma estratégia reprodutiva, já que as fêmeas podem, ocasionalmente, acasalar durante todo o ano, assim o macho deve se manter sempre apto à reprodução.

Apesar desses conhecimentos contribuírem significativamente para o conhecimento dos aspectos bioecológicos e da dinâmica reprodutiva da espécie, ainda existe uma lacuna importante entre os dados referentes às técnicas para obtenção de espermatozoides do rato-do-nariz-vermelho, caracterização de suas particularidades espermáticas e adaptação de protocolos de avaliação andrológica para aplicação futura de biotecnologias conservacionistas.

2.2. Modificações morfofuncionais espermáticas durante o trânsito epididimário

Nos mamíferos, em geral, após o processo conhecido como espermatogênese, que acontece no epitélio seminífero testicular, os espermatozoides formados ainda estão imaturos no lúmen tubular, e adquirem motilidade progressiva e capacidade fertilizante ao longo do trânsito pelo ducto epididimário (James *et al.*, 2020; Sulzyk *et al.*, 2025). O epididímo é um órgão ductal, altamente convoluto, que conecta e transporta os espermatozoides dos ductulos eferentes do testículo ao ducto deferente. Nos roedores, está situado longitudinalmente na borda

testicular, e pode ser segmentado anatomicamente em: segmento inicial e cabeça – porção superior; corpo – segmento intermediário; e cauda – porção inferior (Kempinas e Klinefelter, 2014; Ozkocer e Konac, 2021) (Figura 2). Os segmentos proximais são majoritariamente responsáveis pela maturação espermática, enquanto a região mais distal funciona como reservatório dos espermatozoides (Sudarshani e Wegiriya, 2022).

Histologicamente, cada segmento possui um epitélio com padrões celulares altamente diferenciados, incluindo células principais, basais, *clear*, estreitas, apicais e halo, com elevada capacidade metabólica, endocítica ou secretória (James *et al.*, 2020). As células principais são as mais presentes ao longo de todo o ducto, apesar de apresentarem diferenças estruturais pela diminuição da altura celular e consequente aumento do diâmetro luminal de acordo com a região, e são responsáveis pela secreção de proteínas, íons e moléculas orgânicas que compõem o fluido intraluminal. As células estreitas, apicais e *clear* participam da acidificação do fluido epididimário pela secreção de prótons, enquanto as células *clear* ainda têm atividade endocítica para remoção de diversos tipos de proteínas do lúmen. As células basais expressam proteínas antioxidantes, protegendo as células espermáticas do estresse oxidativo, e as células halo atuam na imunoproteção dos espermatozoides durante o trânsito no epidídimo. Além disso, junções estreitas presentes no epitélio formam uma barreira entre o ambiente intraluminal e a circulação sanguínea, permitindo a manutenção de um ambiente interno adequado e sem interferência dos componentes sanguíneos (Robaire *et al.*, 2006; Marchiani *et al.*, 2017) (Figura 3).

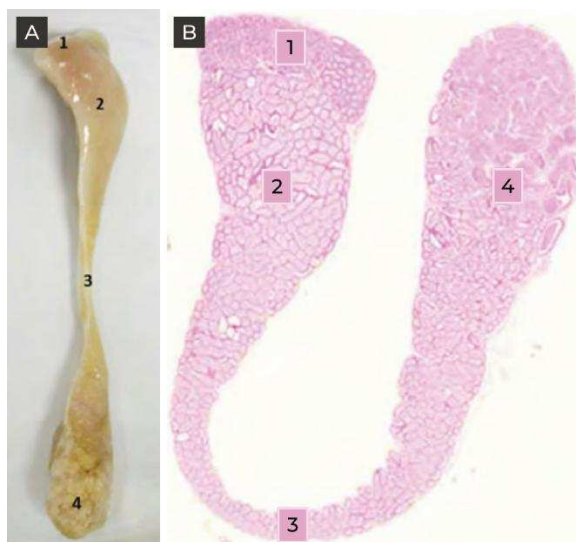


Figura 3. Epidídimo de rato. **A)** Segmentação anatômica macroscópica do epidídimo de rato. **B)** Visão panorâmica de uma secção longitudinal do epidídimo de rato sob microscopia de luz, H&E. (1) Segmento inicial; (2) Cabeça; (3) Corpo; (4) Cauda. Fonte: Kempinas e Klinefelter (2014), Adaptado.

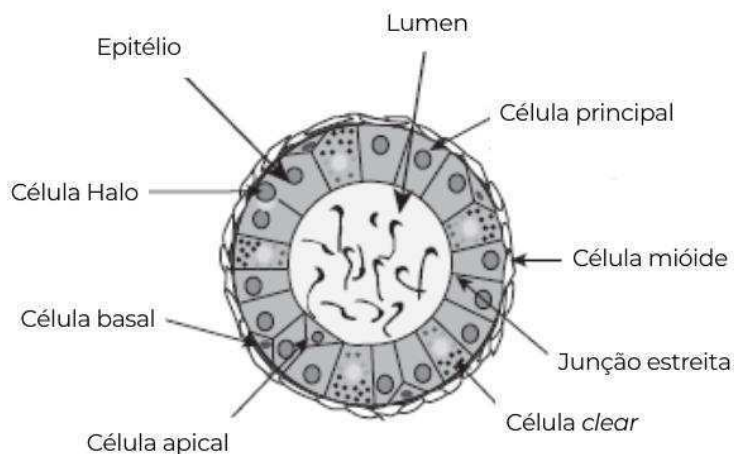


Figura 4. Representação esquemática dos tipos celulares e organização do epitélio epididimário como observado sob microscopia de luz. Fonte: Robaire *et al.* (2006), Traduzido.

Durante esse processo, os espermatozoides são submetidos a mudanças no fluido luminal quanto a osmolaridade, proporção iônica, reservas energéticas e proteínas, modulados por um controle hormonal andrógeno-dependente e por uma complexa regulação de expressão gênica (Oliva *et al.*, 2009; James *et al.*, 2020; Ozkocer e Konac, 2021). Essa composição do fluido epididimário está diretamente associada aos mecanismos de maturação espermática, induzindo modificações na composição e fluidez da membrana plasmática, aquisição da motilidade espermática, formação da matriz acrossomal, migração e remoção das gotas citoplasmáticas, formação das pontes dissulfídicas na cromatina nuclear, e reconhecimento dos sítios da superfície oocitária para interação espermatozoide-zona pelúcida (Oliva *et al.*, 2009).

A membrana plasmática sofre uma remodelação progressiva e sequencial ao longo do trânsito epididimário, transformando a estrutura ainda imatura formada na rede testicular em uma superfície especializada e funcionalmente competente. Esse processo envolve a reorganização da composição macromolecular, com redistribuição de fosfolipídios, incorporação de ácidos graxos poli-insaturados e manutenção dos níveis ideais de colesterol, o que garante maior estabilidade estrutural (Oliva *et al.*, 2009; Moura *et al.*, 2011; Bernabò *et al.*, 2016). Além disso, como o espermatozoide ainda não realiza síntese proteica, depende também da transferência de moléculas externas para completar sua maturação. Assim, ocorre a incorporação de proteínas e glicoproteínas produzidas pelo epitélio epididimário, sendo esse mecanismo mediado pela exposição direta aos diferentes componentes do fluido luminal e pela transferência por vesículas membranosas denominadas epididimossomos (Oliva *et al.*, 2009; Bernabò *et al.*, 2016).

Essas modificações podem ser observadas nas avaliações espermáticas descritas em trabalhos prévios com roedores filogeneticamente próximos ao rato-do-nariz-vermelho. No hamster-dourado (*Mesocricetus auratus*), espécie pertencente à mesma família Cricetidae, Weissenberg *et al.* (1994) avaliaram o processo de maturação dos gametas comparando os parâmetros morfofuncionais de células recuperadas da cabeça, corpo e cauda do epidídimo, e observaram aumento significativo na contagem total de espermatozoides e motilidade progressiva na cauda do epidídimo em comparação à cabeça e corpo. Além disso, a integridade estrutural da membrana espermática, atividade mitocondrial e condensação do DNA também aumentaram significativamente, refletindo em uma maior taxa de oócitos fertilizados (78,3%) quando utilizados espermatozoides recuperados da cauda. Em cutias (*Dasyprocta leporina*), um roedor silvestre que também habita as regiões semiáridas da Caatinga, Dantas *et al.* (2022) observaram um padrão semelhante nos parâmetros espermáticos, destacando ainda a redução progressiva das mensurações morfométricas da cabeça do espermatozoide, que foi associada pelos autores ao aumento da compactação e estabilidade do DNA ao longo do trânsito epididimário.

Após a maturação, os espermatozoides são armazenados em estado quiescente na cauda do epidídimo, uma região com diâmetro luminal maior, revestido por um epitélio comparativamente mais baixo, o que confere grande capacidade de armazenamento. Nesse momento, os espermatozoides apresentam características morfofuncionais semelhantes as do ejaculado, pois já possuem capacidade fecundante, no entanto diferem em relação ao metabolismo e termorresistência (Glover and Nicander, 1971; Sudarshani e Wegiriya, 2022). Apesar de ainda não totalmente elucidado, em ratos e camundongos, o pH e a presença da glicoproteína imobilina, que promove maior viscoelasticidade ao fluido luminal, parecem ser fatores importantes na manutenção do estado quiescente dos espermatozoides durante o período de armazenamento (Carr *et al.*, 1985; Gervasi e Visconti, 2017; Sudarshani e Wegiriya, 2022). Para o rato-do-nariz-vermelho, no entanto, informações relativas a essas características espermáticas durante o trânsito epididimário ainda são desconhecidas.

2.3. Obtenção de espermatozoides epididimário

Na reprodução assistida de espécies silvestres, a coleta de gametas masculinos é frequentemente realizada por eletroejaculação (Castelo e Silva, 2014). Roedores como a cutia-vermelha (*Dasyprocta leporina*) e cutia-parda (*Dasyprocta azarae*), ambos da família Dasyproctidae, têm descrição de técnicas preliminares de coleta de sêmen por este método

(Mollineau *et al.*, 2008; Mollineau *et al.*, 2010; Martinez *et al.*, 2013). No entanto, não existem relatos de adaptação dessa técnica para cricetídeos, como o rato-do-nariz-vermelho.

Nesse contexto, a coleta de espermatozoides diretamente do epididídimio surge como uma alternativa relativamente fácil de ser aplicada, quando outros métodos de coleta são inviáveis. Essa técnica permite a obtenção de células morfologicamente viáveis com potencial fecundante nos casos em que animais de alto valor genético ou espécies ameaçadas venham subitamente a óbito, ou exclusivamente para fins de pesquisa. Ainda, pode ser aplicada em animais que necessitem passar por esterilização, mas seu material genético precise ser preservado para aplicação em biotecnologias (Martins *et al.*, 2007; Muradas, 2007).

Entre os métodos de coleta dos espermatozoides epididimários, existem variações de técnicas de acordo com a espécie, o porte do animal, a dimensão do epididídimio e escolha individual do manipulador. Entre esses, merecem destaque os métodos de lavagem retrógrada e flutuação. Na lavagem retrógrada, o ducto deferente é cateterizado e uma pressão é aplicada com auxílio de uma seringa preenchida com meio tamponado, injetando essa solução em retrofluxo, levando ao preenchimento da cauda do epididídimio. A partir disso, a cauda do epididídimio é incisionada, e a solução com os espermatozoides dispersos no meio é recuperada (Cary *et al.*, 2004).

No entanto, em pequenos herbívoros, a dimensão do epidídimio podem dificultar a aplicabilidade desta técnica. Assim, o método de recuperação dos espermatozoides por flutuação se torna uma alternativa mais aplicável, onde o epidídimio é dissecado em pequenas secções em um meio tamponado, permitindo a liberação dos espermatozoides de dentro do túbulo epididimário para o meio externo (Silva *et al.*, 2011). Gu *et al.* (2019) descrevem a coleta de espermatozoides da cauda do epidídimio em pequenos herbívoros, incluindo ratos (Rodentia, Rattus), camundongos (Rodentia, Muridae), porquinho-da-india (Rodentia, Caviidae), coelho (Lagomorpha, Leporidae) e hamster-dourado (Rodentia, Cricetidae). Neste último, um representante cricetídeo, a técnica tem sido aplicada em estudos recentes, sendo possível recuperar espermatozoides viáveis (~85%) e com ~80% de motilidade (Tourmente *et al.*, 2022; Sanchez-Rodrigues, 2023).

Após a coleta, a amostra é avaliada para diversos parâmetros de qualidade espermática e pode ser utilizada em biotécnicas reprodutivas, como inseminação, refrigeração e criopreservação de espermatozoides.

2.4. Avaliação dos espermatozoides epididimários

Imediatamente após a coleta de uma amostra espermática, a avaliação desse material é essencial para prever a viabilidade e capacidade fecundante. Rotineiramente, são avaliados conjuntamente os parâmetros de motilidade, que pode ser avaliada subjetivamente ou objetivamente por Análise Computadorizada de Sêmen (CASA), concentração, morfologia espermática, condensação da cromatina, e integridade estrutural e funcional das membranas plasmáticas. Além disso, técnicas complementares podem ser utilizadas, como as avaliações utilizando sondas fluorescentes, morfometria espermática e análise da ultraestrutura por eletromicroscopia, permitindo uma descrição ainda mais acurada.

2.4.1. Parâmetros cinéticos e concentração espermática

A Análise Computadorizada de Sêmen (CASA) é uma avaliação auxiliada por software automatizado, que permite a visualização e digitalização de imagens sucessivas das células em movimento. A sobreposição dessas imagens pode ser utilizada para fornecer informações acuradas, precisas e objetivas dos padrões cinéticos individuais de cada célula espermática (Ferreira *et al.*, 1997; Januskauskas e Zilinskas, 2002). Entre esses padrões, são avaliados: velocidade curvilínea (VCL- $\mu\text{m/s}$), considerada a velocidade da trajetória real do espermatozoide; Velocidade linear progressiva (VSL- $\mu\text{m/s}$), sendo a velocidade média entre a linha reta do primeiro e o último ponto da trajetória espermática; Velocidade média da trajetória (VAP- $\mu\text{m/s}$); Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm); Frequência de batimento flagelar cruzado (BCF- Hz), sendo a frequência em que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento; Retilinearidade ou Índice de Progressão (STR - %), calculado a relação percentual entre VSL e VAP; e Índice de Linearidade (LIN - %), que estima a relação entre VSL e VCL (Verstegen *et al.*, 2002; Matos *et al.*, 2008). Esse método já foi aplicado em pequenos roedores, inclusive cricetídeos, como o hamster-dourado, para estudos de estabelecimento de protocolos de capacitação espermática (Sanchez-Rodriguez *et al.*, 2023), no entanto os padrões cinéticos dos espermatozoides de rato-do-nariz-vermelho ainda não foram descritos.

Para espermatozoides epididimários, determina-se a concentração total de espermatozoides da amostra. Após a leitura e contagem das células na câmara de Neubauer, expresso em 10^6 (milhões) de espermatozoides por microlito, o valor é multiplicado pelo

volume total recuperado. Esse método já foi descrito previamente em preás (Silva, 2013) e cutias (Castelo *et al.*, 2015).

2.4.2. Integridade da cromatina espermática

Durante a espermatogênese, ocorre a diferenciação e reorganização nuclear, em que as histonas somáticas são substituídas por protaminas, proteínas ricas em resíduos de cisteína que se ligam ao DNA. No trânsito epididimário, durante a maturação espermática, os grupos tiol altamente reativos presentes nos resíduos de cisteína são oxidados em ligações dissulfeto, conferindo maior grau de compactação e estabilidade para a cromatina espermática (Balhorn, 1989; Hernández-Ochoa *et al.*, 2006). A permanência de histonas somáticas, anormalidades nas protaminas ou na redução das cisteínas em pontes dissulfeto predis põem a distúrbios de condensação de cromatina que podem levar a quadros de subfertilidade (Britto e Mello, 1988). Desse modo, a integridade da cromatina espermática pode ser avaliada por diferentes métodos já descritos pela utilização de corantes nucleares em microscopia óptica.

O Azul de Toluidina é um corante catiônico que exibe fenômeno de metacromasia induzida, diretamente relacionada à quantidade de sítios de ligação livres no DNA. Na cromatina normal dos espermatozoides, os grupos fosfatos estão bloqueados pelas protaminas e protegidos pelo alto grau de compactação, impedindo que as moléculas do corante se liguem ao DNA, exibindo coloração entre translúcido e azul-claro sob microscopia óptica de luz. No entanto, quando existem distúrbios na cromatina e pouco grau de compactação, ocorrem mais ligações com as moléculas do corante, resultando em uma coloração entre tons de azul escuro à magenta (Rodrigues *et al.*, 2009; Soares *et al.*, 2025). Em camundongos, Krzanowska (1982) observou mudanças na estabilização da cromatina ao aplicar a avaliação com Azul de Toluidina em espermatozoides recuperados de diferentes segmentos epididimários durante a maturação espermática, demonstrando que espermatozoides das porções finais do epidídimo apresentam maior grau de estabilidade e compactação.

2.4.3. Integridade estrutural da membrana plasmática

Avaliar a integridade da membrana plasmática do espermatozoide é essencial, por ser uma região celular de alta sensibilidade a fatores externos. As preparações coradas são amplamente utilizadas, especialmente em uma rotina a campo, devido a sua fácil aplicabilidade. Assim, podem ser utilizados corantes permeáveis ou não à membrana celular para avaliar sua

integridade estrutural (Oliveira *et al.*, 2009), como a associação de eosina-nigrosina, que penetra em espermatozoides possuidores de membrana lesionada, promovendo uma coloração rosa ao núcleo (Tartaglione e Ritta, 2004). Em cricetídeos, hamsters do gênero *Phodopus* foram avaliados para viabilidade espermática utilizando essa associação, com ~85% de viabilidade após recuperação.

Além do uso de corantes supravitais, as sondas fluorescentes, como Iodeto de Propídio (IP) e Hoechst (H33342) podem ser utilizadas para a avaliação desse parâmetro, permitindo uma avaliação ainda mais precisa, de fácil preparação e aplicação (Silva e Guerra, 2012). A sonda IP, que possui afinidade pelo DNA e é impermeável à célula, marca em vermelho o núcleo de células com membrana plasmática lesionada, indicando a penetração dessa molécula (Arruda *et al.*, 2003). De forma associada, podem ser utilizados fluoróforos permeáveis a membrana plasmática, como o H3342, atuando como marcador de membrana íntegra e emitindo fluorescência azul (Kumar *et al.*, 2017).

2.4.4. Integridade funcional da membrana plasmática

A integridade funcional da membrana plasmática na célula espermática é avaliada pelo teste de resistência em meio hiposmótico (HOST), baseado na capacidade da membrana plasmática em manter sua funcionalidade quando exposta a uma solução de baixa osmolaridade. Nessas condições, a célula funcional deve permitir o influxo de fluido através da membrana semi-permeável até atingir o equilíbrio osmótico entre os meios extra e intracelular (Hecht e Jeyendran, 2022). Com a passagem da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular, ocasionando assim o dobramento da cauda (Jeyendran *et al.*, 1984). Assim, é possível prever a funcionalidade da membrana, o que é essencial na etapa de fecundação durante a fusão com o oócito.

No entanto, para aplicar esse teste em diferentes espécies é necessário determinar a osmolaridade específica das soluções utilizadas, que pode variar devido a diferenças interespecíficas do metabolismo e na composição fosfolipídica das membranas (Santos *et al.*, 2013; Varisli *et al.*, 2013). Idealmente, a solução hiposmótica deve exercer um estresse osmótico suficiente para gerar alterações visíveis na avaliação, mas que não promova lise da membrana espermática (Jeyendran *et al.*, 1984). Em chinchilídeos e caviídeos, a solução com 100mOsm/L apresenta melhores resultados para avaliar a funcionalidade da membrana espermática (Ponce *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2017), enquanto para roedores murinos a água destilada (0mOsm/L) é comumente utilizada nos protocolos de avaliação (Silva *et al.*, 2011).

Em contraste, para dasiproctídeos, a solução intermediária de frutose com 50mOsm/L mostrou resultados mais fidedignos para a avaliação seminal, com mais de 80% de espermatozoides recuperados da cauda epididimária reativos à incubação (Dantas *et al.*, 2022). É válido mencionar que o teste ainda não foi aplicado em espermatozoides do rato-do-nariz-vermelho, sendo necessário realizar testes com soluções de diferentes osmolaridades para definir a mais adequada para a espécie.

2.4.5. Morfologia e morfometria espermática

A morfologia espermática envolve a avaliação microscópica da estrutura do espermatozoide, e prediz a porcentagem de anormalidades em uma amostra. Dessa forma, pode indicar problemas no sistema reprodutor, pois determinados defeitos espermáticos também podem refletir a saúde dos túbulos seminíferos e epidídimos, relacionados a problemas de maturação ou ainda a defeitos genéticos (Barth e Oko, 1989). A alta frequência de anormalidades espermáticas ou alta incidência de um defeito podem estar diretamente correlacionadas a subfertilidade (Arruda *et al.*, 2011).

Este parâmetro pode ser analisado pela técnica de câmara úmida com soluções corantes, comumente utilizando Rosa de Bengala (Silva *et al.*, 2011) ou Karras (Kanazawa *et al.*, 2012). Na avaliação, são contadas 200 células por amostra, e os defeitos podem ser classificados de acordo com a estrutura espermática envolvida, como defeitos de acrossomo, cabeça, colo, peça intermediária ou de cauda espermática (Rufino *et al.*, 2018). Em preás, Silva (2013) relata $58,6 \pm 4,8\%$ de espermatozoides epididimários morfologicamente normais, enquanto para capivaras esse resultado tem média de $51,3 \pm 19,42\%$ (Rodriguez *et al.*, 2012), e cutias alcançam até $91,9 \pm 1,3\%$ (Silva *et al.*, 2011; Dantas *et al.*, 2022).

As dimensões medidas das regiões estruturais das células espermáticas podem ser utilizadas como uma forma de avaliação ainda mais objetiva das características morfológicas. Esse parâmetro pode permitir a identificação de características ou alterações que não seriam visualizadas convencionalmente, para ampliar o estudo da biologia reprodutiva ou para avaliar e otimizar as estratégias de reprodução assistida (Santiago-Moreno *et al.*, 2016). Entre os métodos de se analisar a morfometria espermática, as imagens digitalizadas dos espermatozoides podem ser submetidas a analisadores automatizados, por meio de sistemas computadorizados de análise morfométrica (CASMA), ou por métodos manuais, como a utilização de software de análise digital, como o ImageJ (Barbosa *et al.*, 2019).

Dantas *et al.* (2022) avaliaram a morfometria de espermatozoides recuperados de diferentes regiões epididimárias, observando redução das mensurações de comprimento e largura da cabeça espermática, com $4,35 \pm 0,02 \mu\text{m}$ e $2,91 \pm 0,02 \mu\text{m}$ na região da cabeça do epidídimo, e $4,13 \pm 0,01 \mu\text{m}$ e $2,76 \pm 0,01 \mu\text{m}$ na região da cauda. Os autores discutem que esta redução pode estar relacionada a maturação espermática e o processo de condensação e compactação da cromatina, que reduz o volume nuclear. Além disso, um aumento do comprimento da peça intermediária foi observado na espécie ($4,56 \pm 0,02 \mu\text{m}$ na região da cabeça, e $4,66 \pm 0,01 \mu\text{m}$ na região da cauda), provavelmente relacionada ao desenvolvimento do aparato mitocondrial, proporcionando maior capacidade para aquisição da motilidade espermática. Em cricetídeos, León-Tapia e Cervantes (2019) avaliaram a morfometria espermática do rato-da-madeira de Goldman (*Nelsonia goldman*), atingindo valores proporcionalmente maiores do que a maioria das outras espécies de roedores, com $182,52 \pm 1,62 \mu\text{m}$ de comprimento total.

2.4.6. Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica

Adicionalmente, para uma maior riqueza de detalhes, podem ser realizadas análises morfológicas através da microscopia eletrônica. Enquanto a microscopia óptica se baseia na emissão de fótons, que interagem com as estruturas da amostra e são transmitidos, absorvidos ou refletidos para formação das imagens, a microscopia eletrônica utiliza feixes de elétrons, que apresentam comprimento de onda significativamente menor do que a luz visível, associado a uma maior capacidade de penetração na amostra (Metilli *et al.*, 2020).

A microscopia eletrônica envolve a aceleração dos elétrons e o direcionamento do feixe resultante diretamente na amostra, conferindo a capacidade da técnica de ultrapassar a limitação de resolução da microscopia óptica e permitindo a observação detalhada de aspectos ultraestruturais do material analisado (Dedavid *et al.*, 2007; Metilli *et al.*, 2020). No entanto, como o feixe de elétrons é mantido sob vácuo, amostras biológicas submetidas a essa avaliação exigem um processamento prévio para suportarem essas condições. Esse processamento envolve etapas de fixação, desidratação, seccionamento e marcação dessas amostras, preservando suas características (Golmohammadzadeh *et al.*, 2023).

Na tecnologia do sêmen, a microscopia eletrônica tem sido utilizada para aprofundar o conhecimento através de estudos descritivos e comparativos, permitindo a caracterização de padrões espermáticos das diferentes espécies, ou auxiliando na avaliação da eficiência de biotecnologias aplicadas à reprodução. Nesse contexto, a técnica possibilita avaliar

precisamente a integridade de estruturas biológicas e visualizar regiões específicas, como acrossomo, cromatina, teca perinuclear, mitocôndrias, axonema, periaxonema e outras estruturas que não são detectáveis por microscopia óptica convencional (Moriatti *et al.*, 2016). Em roedores cricetídeos, Morais *et al.* (2014) aplicaram a microscopia eletrônica de transmissão (MET) na avaliação da dinâmica espermatogênica de *Oxymycterus nasutus*, caracterizando a ultraestrutura das espermátides durante o desenvolvimento acrossomal e formação flagelar.

Em outro estudo, Breed *et al.* (2014) aplicaram a microscopia eletrônica na investigação da diversidade morfológica da cabeça dos espermatozoides de diferentes famílias de roedores e suas relações filogenéticas. Foi observado que espécies mais próximas da base ancestral muroide, como roedores da família Dipodidae, apresentam cabeça do espermatozoide arredondada, enquanto, a partir de uma posição filogenética com ancestral comum aos Nesomyidae, os espermatozoides desenvolvem um gancho apical que é mantido na maioria dos membros dessas linhagens (Figura 4). A manutenção dessa característica em espécies subsequentes suporta as hipóteses de que essa estrutura está envolvida na seleção pós-copulatória, e desempenha um papel importante na motilidade, competição espermática e capacidade de fertilização (Varea-Sánchez *et al.*, 2016; Hook *et al.*, 2021).

Contudo, apesar da significativa capacidade descritiva que essa técnica pode fornecer, ainda não foi aplicada na caracterização e avaliação de espermatozoides de rato-do-nariz-vermelho.

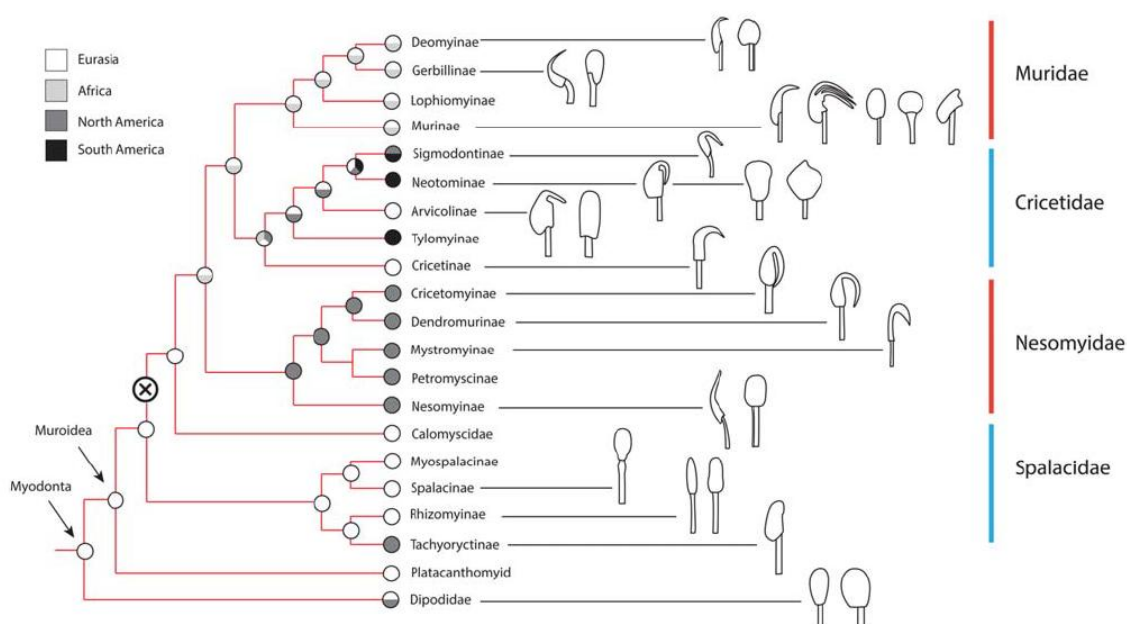


Figura 5. Filogenia de roedores muroides com esboço da morfologia da cabeça dos espermatozoides de cada representante das famílias e subfamílias. Fonte: Breed *et al.* (2014).

3. JUSTIFICATIVA

Os estudos acerca da fisiologia reprodutiva da mastofauna da Caatinga permanecem ainda incipientes, o que dificulta a compreensão e o desenvolvimento de esforços científicos conservacionista nessa região. A singularidade desse bioma exclusivamente brasileiro, bem como da sua rica biodiversidade, contrasta com a constante ameaça pela degradação ambiental, desmatamento e mudanças climáticas. Como consequência, as projeções indicam que o rato-do-nariz-vermelho pode sofrer com a perda de áreas nativas na Caatinga, gerando impactos ecológicos pelo desequilíbrio da dinâmica ambiental. Nesse sentido, estudos voltados para a fisiologia reprodutiva e conservação são ainda mais importantes para manutenção do equilíbrio ecológico e diversidade genética.

A caracterização morfofuncional dos espermatozoides possibilita não apenas o registro e ampliação do conhecimento sobre uma espécie, como também a compreensão de relações taxonômicas e a utilização dessa base de dados em biotecnologias conservacionistas mais avançadas. Apesar de ser uma espécie endêmica na Caatinga, a literatura discute a escassez de espécimes de *W. pyrrhorhinos* disponíveis para estudo, devido às limitações dos métodos de captura utilizados, que dependem da presença de ninhos, sejam próprios ou de aves abandonados, ou em arbustos, para realização de uma coleta manual. A possibilidade de manter essa espécie em criatório científico para o desenvolvimento de pesquisas possibilita estudos com um maior número de animais, gerando resultados de maior confiabilidade.

Nesse contexto, a descrição morfofuncional dos espermatozoides epididimários de rato-do-nariz-vermelho pode ser um passo inicial para conservação da viabilidade genética da espécie, e ser usada como base em aplicações de biotécnicas reprodutivas conservacionistas preventivas.

4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS

- I. Os espermatozoides de rato-do-nariz-vermelho recuperados de diferentes segmentos epididimários apresentam modificações morfofuncionais relacionadas a maturação espermática na espécie.
- II. A funcionalidade da membrana plasmática dos espermatozoides epididimários de rato-do-nariz-vermelho difere significativamente entre os segmentos cabeça, corpo e cauda do epidídimo, e a avaliação deste parâmetro depende da osmolaridade da solução utilizada no teste hiposmótico.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo geral

- Descrever as características morfofisiológicas de espermatozoides durante o trânsito epididimário de ratos-do-nariz-vermelho (*Wiedomys pyrrhorhinos*) criados em cativeiro.

5.2. Objetivos específicos

- Descrever o perfil de concentração espermática, os parâmetros cinéticos, a integridade da cromatina e a integridade da membrana plasmática dos espermatozoides de *W. pyrrhorhinos* em cada segmento epididimário;
- Caracterizar as modificações estruturais morfológicas, morfométricas e ultraestruturais dos espermatozoides de rato-do-nariz-vermelho durante a maturação ao longo do trânsito epididimário;
- Comparar diferentes soluções hiposmóticas para identificar a osmolaridade mais adequada na avaliação da funcionalidade da membrana plasmática em *W. pyrrhorhinos*;
- Comparar a resposta ao teste de resistência em meio hiposmótico entre espermatozoides recuperados dos diferentes segmentos epididimários do rato-do-nariz-vermelho;
- Correlacionar a funcionalidade da membrana plasmática de espermatozoides do rato-do-nariz-vermelho com outros parâmetros espermáticos recuperados em cada segmento epididimário.

REFERÊNCIAS

- ARRUDA, R. P.; BALL, B. A.; GRAVANCE, C. G.; LIU, I. K. M. Determinação da integridade da membrana e acrossomo de espermatozoides de garanhões pela técnica de citometria de fluxo. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.31, p.226-227, 2003.
- ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C.; ALONSO, M.A.; CARVALHO, H.F.; OLIVEIRA, L.Z.; NASCIMENTO, J.; SILVA, D.F.; AFFONSO, F.J.; LEMES, K.M.; JAIMES, J.D. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.2, p.145-151, 2011.
- BALHORN, R. Mammalian Protamines: Structure and Molecular Interactions. In: Adolph, K.W. (eds) *Molecular Biology of Chromosome Function*. Springer, New York, NY, 1989.
- BARBOSA, B. S.; SILVA, H. V. R.; TABOSA, B. E. A.; NUNES, T. G. P.; MAGALHÃES, F. F.; SILVA, L. D. M. Morphological and morphometric characterization of domestic cat epididymal sperm. *Reproduction in Domestic Animals*, v.54, n.12, p.1-7, 2019.
- BARTH, A. D.; OKO, R. J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. Ames: Iowa State University Press, 1989.
- BERNABÒ, N.; AGOSTINO, R.D.; ORDINELLI, A.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. The maturation of murine spermatozoa membranes within the epididymis, a computational biology perspective. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, v.62, n.5, p.299-308, 2016.
- BOCCHIEGLIERI, A.; CAMPOS, J.B.; REIS, M.L. Ocorrência e uso de abrigo por *Wiedomys pyrrhorhinus* (Rodentia: Cricetidae) em áreas de caatinga de Sergipe, Brasil. *Scientia Plena*, v.8, p.111001, 2012.
- BONVÍCIO, C.R.; OLIVEIRA, J.A.; D'ANDREA, P.S. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008.
- BREED, W.G.; LEIGH, C.M.; APLIN, K.P.; SHAHIN, A.A.B.; AVENANT, N.L. Morphological Diversity and Evolution of the Spermatozoon in the Mouse-Related Clade of Rodents. *Journal of Morphology*, v.275, p.540-547, 2014.
- BRITTO, C.M.C.; MELLO, M.L. Induced nuclear metachromasy evaluated in spermatozoa of bulls. *Brazilian Journal of Genetics*, v.11, n.3, p.349-354, 1988.
- BRONSON, F.H. Mammalian reproduction: an ecological perspective. *Biology of Reproduction*, v.32, n.1, p.1-26, 1985.
- CARR, D.W.; USSELMAN, M.C.; ACOTT, T.S. Effects of Ph, Lactate, and Viscoelastic Drag on Sperm Motility: A Species Comparison. *Biology of Reproduction*, v.33, p.588-595, 1985.

CARY, J.A.; MADILL, S.; FARNSWORTH, K.; HAYNA, J.T.; DUOOS, L.; FAHNING, M.L. A comparison of electroejaculation and epididymal sperm collection techniques in stallion. *Canadian Veterinary Journal*, v.4, p.35-41, 2004.

CASTELO, T.; SILVA, A.R. Eletroejaculação em mamíferos silvestres: principais fatores que afetam sua eficiência. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.38, p.208-213, 2014.
CASTELO, T.S.; SILVA, A.M.; BEZERRA, L.G.; COSTA, C.Y.; LAGO, A.E.; BEZERRA, J.A.; CAMPOS, L.B.; PRAXEDES, E.C.; SILVA, A.R. Comparison among different cryoprotectants for cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta leporina*). *Cryobiology*, v.71, p.442-447, 2015.

CASTELO, T.S.; SILVA, A.M.; PEIXOTO, G.C.X.; SOUZA, A.L.P.; CAMPOS, L.B.; LIMA, G.L.; DANTAS, M.R.T.; SOUZA-JUNIOR, J.B.F.; SILVA, A.R. Cryopreservation efficiency of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*) sperm obtained from different origins through epididymal retrograde flushing or electroejaculation. *Cryobiology*, v.113, p.104787, 2023.

CUNHA-FILHO, C.A. Implicações taxonômicas e biogeográficas da variação morfológica em *Wiedomys* (Rodentia, Sigmodontinae). 2019. 113f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Conservação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

DANTAS, M.R.T.; SILVA, A.M.; BEZERRA, L.G.P.; PEREIRA, A.G.; LUZ, N.R.N.; SOUZA-JUNIOR, J.B.F.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Morphological, morphometric, ultrastructural, and functional evaluation of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*) sperm during epididymal transit. *Animal Reproduction Science*, v.243, p.107029, 2022.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia eletrônica de varredura: Aplicações e preparação de amostras: Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2007.

EISENBERG, J.F.; REDFORD, K.H. *Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics*, v.3. The University of Chicago Press, 1999.

FARIA, M.B.; KAIZER, M.C. Pequenos mamíferos não-voadores (Didelphimorphia e Rodentia): estudo de impacto ambiental em uma região de ecótono entre a Mata Atlântica e a Caatinga. *Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia*, v.89, p.74-82, 2020.

FERREIRA, J.C.P.; NEVES-NETO, JR.; PAPA, F.O. Avaliação computadorizada das características espermáticas de garanhões com fertilidade comprovada. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.21, p.131-32, 1997.

GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology*. v.5, p.204-218, 2017.

GLOVER, T.; NICANDER, L. Some aspects of structure and function in the mammalian epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.13, n.13, p.39-50, 1971.

GOLMOHAMMADZADEH, M.; SEXTON, D.L.; PARMAR, S.; TOCHEVA, E.I. Advanced imaging techniques: Microscopy. *Advances in Applied Microbiology*, v.122, p.1-25, 2023.

GU, N.; ZHAO, W.; WANG, G.; SUN, F. Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.17, n.66, 2019.

HECHT, B.R.; JEYENDRAN, R.S. The hypo-osmotic swelling test: Is It a sperm vitality or a viability assay?. *Fertility and Sterility*, 2022, v.3, n.1, p.18-20, 2022.

HERNÁNDEZ-OCCHOA, I.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M.; SOLÍS-HEREDIA, M.J.; QUINTANILLA-VEJA, B. Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation. *Reproductive Toxicology*, v.21, p.171-178, 2006.

HOOK, K.A.; WILKE, L.M.; FISHER, H.S. Apical Sperm Hook Morphology Is Linked to Sperm Swimming Performance and Sperm Aggregation in *Peromyscus* Mice. *Cells*, v.10, p.2279, 2021.

JAMES, E.R.; CARRELL, D.T.; ASTON, K.I.; JENKINS, T.G.; YESTE, M.; SALAS-HUETOS, A. The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, v.21, n.15, p.5377, 2020.

JANUSKAUSKAS, A.; ZILINSKAS, H. Bull semen evaluation post-thaw and relation semen characteristics to bulls fertility. *Veterinarija Ir Zootechnika*, v.39, p.1-8, 2002.

JEYENDRAN, R.; VAN DER VEN, H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, M.; ZANEVELD, L. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relation to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility*, v.70, p.219-228, 1984.

KANAZAWA, M.Y.; SCOTT, C.; WILGES, C.H.M.; DIAS, L.G.G.G.; SOUZA, F.F. Correlação da circunferência escrotal, citologia testicular e parâmetros do sêmen do epidídimo de touros. *Enciclopedia Biosfera*, v.8, n.15. p.517, 2012.

KEMPINAS, W.G.; KLINEFELTER, G.R. Interpreting histopathology in the epididymis. *Spermatogenesis*, v.4, n.2, e979114, 2015.

KRZANOWSKA, H. Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.64, n.1, p.97-101, 1982.

KUMAR, P.; SRIVASTAVA, N.; PANDE, M.; PRASAD, J.K.; SIROHI, A.S. Evaluating Sperm Cell Viability and Membrane Integrity. In: Srivastava, N., Pande, M. (eds) *Protocols in Semen Biology (Comparing Assays)*. 2017.

LEAL, I.R.; SILVA, J.M.C.; TABARELLI, M.; LACHER JR, T.E.L. Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga. *Megadiversidade*, v.1, n.1, 2005.

LEÓN-TAPIA, M.A.; CERVANTES, F.A. First contribution to the description of reproductive structures of *Nelsonia goldmani* (Rodentia: Cricetidae). *Therya*, v.10, n.2, p.155-160, 2019.

- MANGAN, S.A.; ADLER, G.H. Consumption of arbuscular mycorrhizal fungi by terrestrial and arboreal small mammals in a Panamanian cloud forest. *Journal of Mammalogy*, v.81, p.563-570, 2000.
- MARCHIANI, S.; TAMBURRINO, L.; MURATORI, M.; BALDI, E. Epididymal sperm transport and fertilization. In: SIMONI, M.; HUHTANIEMI, I.T. eds. *Endocrinology of the testis and male reproduction*. Cham: Springer International Publishing, p.365-383, 2017.
- MARINHO-FILHO, J.; LANGGUTH, A. *Wiedomys pyrrhorhinos*. The IUCN Red List of Threatened Species, e.T23076A22340180, 2017. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2017-2.RLTS.T23076A22340180.en>. Acessado em: 21 Dez 2025.
- MARTINEZ, A.C.; OLIVEIRA, F.S.; ABREU, C.O.; MARTINS, L.L.; PAULONI, A.P.; MOREIRA, N. Colheita de sêmen por eletroejaculação em cutia-parda (*Dasyprocta azarae*). *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.33, n.1, p.86-88, 2013.
- MARTINS, C.F.; RUMPF, R.; PEREIRA, D.C.; DODE, M.N. Cryopreservation of epididymal bovine spermatozoa from dead animals and its uses in vitro embryo production. *Animal Reproduction Science*, v.101, p.326-331, 2007.
- MATOS, D.L.; ARAÚJO, A.A.; ROBERTO, I.G.; TONIOLLI, R. Computer-assisted sperm analysis (CASA): a review. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.32, n.4, p.225-232, 2008.
- METILLI, L.; FRANCIS, M.; POVEY, M.; LAZIDIS, A.; MARTY-TERRADE, S.; RAY, J.; SIMONE, E. Latest advances in imaging techniques for characterizing soft, multiphasic food materials. *Advances in Colloid and Interface Science*, v.279, 102154, 2020.
- MOLLINEAU, W.M.; ADOGWA, A.O.; GARCIA, G.W. A preliminary technique for electro-ejaculation of agouti (*Dasyprocta leporine*). *Animal Reproduction Science*, v.108, p.92-97, 2008.
- MOLLINEAU, W.M.; ADOGWA, A.O.; GARCIA, G.W. Improving the efficiency of the preliminary electroejaculation technique developed for semen collection from the agouti (*Dasyprocta leporina*). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, v.41, n.4, p.633-637, 2010.
- MORAIS, A.C.T.; BALARINI, M.K.; LOPES, E.O.; MENEZES, T.P.M.; QUINTELA, F.M.; MORAIS, D.B.; GOMES, M.L.M.; MATTA, S.L.P. The tubular compartment and the spermatogenic dynamics of the wild rodent *Oxymycterus nasutus* (Rodentia: Cricetidae). *Animal Reproduction Science*, v.149, p.249-258, 2014.
- MORIETTI, E.; SUTERA, G.; COLLODEL, G. The importance of transmission electron microscopy analysis of spermatozoa: Diagnostic applications and basic research. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, v.62, p.171-183, 2016.
- MOURA, A.A.; ANDRADE, C.R.; SOUZA, C.E.A.; RÊGO, J.A.M.; OLIVEIRA, R.V.; MMENEZES, E.B.S. Proteínas do plasma seminal, funções esperáticas e marcadores moleculares da fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.35, n.2, p.139-144, 2011.

MOURA, M.R.; OLIVEIRA, G.A.; PAGLIA, A.P.; PIRES, M.M.; SANTOS, B.A. Climate change should drive mammal defaunation in tropical dry forests. *Global Change Biology*, v.29, p.6931-6944, 2023.

MURADÁS, P.R. Viabilidade e teste de criopreservação de espermatozoide colhido da cauda do epididimo de equino. 2007, 77 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias), Curso de Pósgraduação em Ciências Veterinárias, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná- UFRP, Curitiba 2007.

OLIVA, S.U.; RINALDO, P.A.; STUMMPP, T. Epididymal biology: spermatogenic maturation and gene expression. *O Mundo da Saúde*, v.33, n.4, p.419-425, 2009.

OLIVEIRA, R. V.; NUNES, J. F.; SALGUEIRO, C. C. M.; CAVALCANTE, J. M. M.; MOURA, A. A. A.; ARAÚJO, A. A. Avaliação morfológica de espermatozoides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou TRIS, corados por eosina-nigrosina e azul de bromofenol. *Ciência Animal Brasileira*, v.10, p.862-869, 2009.

OZKOCER, S.E.; KONAC, E. The current perspective on genetic and epigenetic factor in sperm maturation in the epididymis. *Andrologia*, v.53, p.13989, 2021.

PONCE, A.A.; AIRES, V.A.; CARRASCOSA, R.; FIOL DE CUNEO, M.; RUIZ, R.D.; LACUARA, J.L. Functional activity of epididymal Chinchilla kaniger spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Research in Veterinary Science*, v.64, p.239-243, 1998.

ROBAIRE, B.; HINTON, B.T.; ORGEBIN-CRIST, M. The Epididymis. In: Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, Third Edition, 2006.

RODRIGUES, A.C.N.; ROCHA, J.V.; BELETTI, M.E. Análise computacional da compactação da cromatina de espermatozoides de galo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.6, p.1302-1307, 2009.

RODRIGUEZ, J.; PEÑA M.; GÓNGORA, A.; MURILLO, R. Obtención y evaluación del semen de capibara *Hydrochoerus hydrochaeris*. *Revista MVZ Córdoba*, v.17, n.2, p.2991-2997, 2012.

RUFINO, J.P.F.; CRUZ, F.G.G.; MELO, R.D.; FEIJÓ, J.C.; MELO, L.D.; COSTA, A.P.G.C.; BEZERRA, N.S. Brazil nut oil in diets for breeder cocks. *Acta Scientiarum, Animal Science*, v.40, e37472, 2018.

SANCHEZ-RODRIGUES, A.; IDROVO, I.I.D.; RIELO, J.A.; ROLDAN, E.R.S. Sperm Capacitation and Kinematics in *Phodopus* Hamsters. *International Journal of Molecular Sciences*, v.24, n.22, 2023.

SANTIAGO-MORENO, J.; ESTESO, M. C.; VILLAYERDE-MORCILLO, S.; TOLEDANO-DIAZ, A.; CASTAÑO, C.; VELÁZQUEZ, R.; LOPEZ-SEBASTIAN, A.; GOYA, A. L.; MARTÍNEZ, J. G. Recent advances in bird sperm morphometric analysis and its role in male gamete characterization and reproduction Technologies. *Asian Journal of Andrology*, v.18, p.882–888, 2016.

SANTOS, E.A.A.; SOUSA, P.C.; PEIXOTO, G.C.X.; SIMÃO, B.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia, v.65, p.1257-1260, 2013.

SILVA, A.M. Coleta e caracterização de espermatozoides epididimários de preás (*Galea spixii* Wagler, 1831). 2013. 44f. Monografia (Graduação) – Graduação em Zootecnia, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, 2013.

SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.X.; SANTOS, E.A.A.; CASTELO, T.S.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasiprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. Theriogenology, v.76, p.1084-1089, 2011.

SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. Revista Brasileira de Reprodução Animal, v.35, n.4, p.370-384, 2011.

SILVA, A.M.; BEZERRA, J.A.B.; CAMPOS, L.B.; PRAXEDES, E.C.G.; LIMA, G.L.; SILVA, A.R. Characterization of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831) recovered by different methods. Acta Zoologica Online, v.98, p.285-291, 2017.

SOARES, V.N.; ZABEU, M.G.; CARDOSO, R.C.S. Utilização do azul de toluidina para avaliação da cromatina de espermatozoides – Revisão de literatura. In: Semana Científica do Agreste Pernambucano. Anais...Garanhuns. Universidade de Pernambuco, 2025.

SOBRAL, G.; OLIVEIRA, J.A. Annual age structure and reproduction in the Caatinga red-nosed mouse *Wiedomys pyrrhorhinos*. Therya, v.5, n.2, p.509-534, 2014.

SUDARSHANI, K.A.M.; WEGIRIYA, H.C.E. An investigation on cauda storage of sperm in hamster epididymis. Animal Biology, v.72, p.367-383, 2022.

SULZYK, V.; CURCI, L.; GONZÁLEZ, L.N.; CID, A.R.; MUÑOZ, M.W.; CUASNICU, P.S. The epididymis contributes to sperm DNA integrity and early embryo development through Cysteine-Rich Secretory Proteins. Developmental Biology, v.3, RP97105, 2025

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-tawed bull semen. Theriogenology, v.62, p.1245-1252, 2004.

TOURMENTE, M.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, A.; ROLDAN, E.R.S. Effect of Motility Factors D-Penicillamine, Hypotaurine and Epinephrine on the Performance of Spermatozoa from Five Hamster Species. Biology, v.11, n.4, p.526, 2022.

VAREA-SÁNCHEZ, M.; TOURMENTE, M.; BASTIR, M.; ROLDAN, E.R.D. Unraveling the Sperm Bauplan: Relationships Between Sperm Head Morphology and Sperm Function in Rodents. Biology of Reproduction, v.95, n.1, p.1-9, 2016.

VARISLI, O.; SCOTT, H.; AGCA, C.; AGCA, Y. The effects of cooling rates and type of freezing extenders on cryosurvival of rat sperm. *Cryobiology*, v.67, p.109-116, 2013.

VERSTEGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, v.57, p.149-179, 2002.

CAPÍTULO I

Regional morphofunctional features of sperm maturation in the epididymis of the red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*)

Periódico: Reproduction, Fertility and Development (Submetido)

QUALIS: A2

Fator de Impacto: 1.8

[Original research paper]: Reproduction, Fertility and Development

Regional morphofunctional features of sperm maturation in the epididymis of the red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*)

Yuri Gonçalves Matos¹, Romário Parente dos Santos¹, Andreia Maria da Silva¹, Luana Grasielle Pereira Bezerra¹, Pedro Augusto Pinheiro Brito¹, Gabriel Santos Costa Bezerra¹, Radan Elvis Matias de Oliveira², Moacir Franco de Oliveira², Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

²Laboratory of Applied Animal Morphophysiology (LABMORFA), Federal Rural University of Semi-Arid (UFERSA), 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

*Corresponding author: alexrs@ufersa.edu.br (AR Silva). Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Department of Animal Sciences, Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

Abstract

The red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*) is a small rodent of the Caatinga, but the accelerated degradation caused by ecologically unsustainable anthropogenic activities threatens the mammalian fauna of this biome. Therefore, this study aimed to characterize the morphofunctional parameters of epididymal spermatozoa of *W. pyrrhorhinos* during epididymal transit. Seven adult male specimens were used, weighing 43.7 ± 4.3 g and aged 7.0 ± 0.6 months. For use in several simultaneous experiments, the animals were euthanized by cervical dislocation and testis-epididymis complexes were collected for sperm recovery from the different segments of the epididymis (caput, corpus and cauda) by *slicing* technique. Samples were immediately assessed for sperm concentration, kinetic patterns (CASA), chromatin integrity, structural integrity of the plasma membrane, sperm morphology, and ultrastructural evaluation by scanning electron microscopy. Data were compared using Kruskal-Wallis test or ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test ($P < 0.05$). All results were expressed as mean $\pm$ standard error. As epididymal transit occurred, a significant increase ($P < 0.05$) in sperm concentration was observed towards the cauda region ($138.8 \pm 31.8 \times 10^6$ sperm/mL). Chromatin integrity increased progressively along epididymal transit, with highest percentages in corpus ($84.9 \pm 3.9\%$) and cauda ($92.1 \pm 2.2\%$). Sperm viability and kinetic parameters did not differ significantly between the different regions. Normal spermatozoa were significantly higher in cauda ($93.8 \pm 0.9\%$), characterized by SEM as an elongated smooth oval head, hook-shaped acrosome, asymmetric head-midpiece implantation and filamentous tail. Patterns was consistent with phylogenetically related rodents, such as the domestic hamster. Therefore, we contributed by providing data that deepens the knowledge of reproductive biology in *W. pyrrhorhinos*.

Keywords: Caatinga, cricetid, reproductive biology, rodent.

1. Introduction

Among the small rodents of the Caatinga, the *Wiedomys pyrrhorhinos* (Wied-Neuwied, 1821), commonly known as red-nosed-mouse, is a sigmodontine cricetid with distribution restricted to this morphoclimatic domain (Cunha-Filho, 2019). It is considered an endemic species of the Caatinga, however, its distribution is not homogeneous, and its population density is sensitive to different biogeographical patterns of this biome, such as vegetation, geological formations, rainfall variations, and food availability (Sobral and Oliveira, 2014). Additionally, habitat fragmentation within the biome results in discontinuities in the geographic distribution of the red-nosed-mouse (Cunha-Filho, 2019). These small mammals influence environmental dynamics through the predation and dispersal of seeds, seedlings and mycorrhizal fungi (Mangan and Adler, 2000), and contribute to maintaining predator-prey balance within food chain. Furthermore, given their sensitivity to environmental factors, their demography may serve as an ecological bioindicator of habitat alterations (Faria and Kaizer, 2020).

As a consequence of accelerated degradation caused by ecologically unsustainable anthropogenic activities, the mammalian fauna of the Caatinga faces constant threats from habitat exploitation, destruction, and the resulting climate changes (Moura *et al.*, 2023). Consequently, population decline, species migration, and habitat homogenization may lead to ecosystem collapse, a scenario already predicted for small rodents of the genus *Wiedomys* (Moura *et al.*, 2023). In addition, the region is notoriously neglected from scientific perspective, with a scarcity of consistent information regarding the ecology and physiology of its biota, including the red-nosed-mouse, which hinders the development of effective conservation policies (Leal *et al.*, 2005).

Although still incipient, some researchers have sought to prioritize studies in this region, aiming to fill the gaps in knowledge of Caatinga biodiversity (Barbosa and Filho, 2022). In agoutis (*Dasyprocta spp.*), as a rodent native from the same biome, Dantas *et al.* (2022) applied the *slicing* technique for collection of epididymal spermatozoa when semen collection was not viable. This approach was useful for the characterization of morphophysiological features throughout epididymal maturation, when sequential biochemical changes occurs and sperm undergo alterations in size, morphology and functional properties (Soler *et al.*, 1994; Reilly *et al.*, 2016). Such knowledge was fundamental to support the subsequent application of advanced reproductive biotechnologies, such as semen cryopreservation, later developed in the species by Castelo *et al.* (2023).

Similarly, the understanding of physiology in *W. pyrrhorhinos* is essential for establishing effective conservation strategies in future. Nevertheless, studies on this rodent remain insufficient to fully elucidate its reproductive physiology, and since the sperm morphology of the genus *Wiedomys* remains unknown, describing these features may provide biological information that contributes to scientific development (León-Tapia and Cervantes, 2019). Therefore, this study aims to address these gaps by characterizing the morphofunctional parameters of *W. pyrrhorhinos* spermatozoa during epididymal transit.

2. Material and methods

2.1. Animals

This study was approved by the Animal Ethics Committee of the Federal Rural University of the Semi-Arid (CEUA/UFERSA: No. 37/2025), and conducted in accordance with current international animal welfare guidelines. In addition, authorization was obtained from the Brazilian Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio/SISBIO No. 84083-1).

The animals were obtained from the Center of Wild Animals Multiplication (CEMAS/UFERSA, Mossoró, RN, Brazil, 5°10'S 37°10'W). CEMAS is registered with IBAMA as a scientific breeding (No. 1478912), where programmed slaughter is conducted annually to population control, and the specimens are provided for use in different experiments. For this project, seven adult male animals were used, weighing 43.7 ± 4.3 g and aged 7.0 ± 0.6 months, intended for morphofunctional characterization of spermatozoa during epididymal transit. The animals were fed daily with a diet consisting of specific rodent chow, fruit, soybeans, mature corn and water *ad libitum*. Experimental collections were carried out between June and August 2023 (dry season in the Caatinga) and April to August 2025 (transition from rainy to dry seasons in the Caatinga).

2.2. Recovery of epididymal sperm

Initially, the selected animals were subjected to anesthesia using xylazine hydrochloride (Xilazin® 2%, Syntec, 1mg/kg) and ketamine hydrochloride (Quetamina® 10%, Vetnil, 15mg/kg) administered intramuscularly as pre-anesthetic medication, followed by thiopental (Tiopental sódico® 1g, Richmond, División Veterinaria S.A., 30mg/kg) as a general anesthetic. Once the surgical plane of anesthesia was achieved, euthanasia was performed by cervical

dislocation, in accordance with the Brazilian Guidelines for Good Practices in Animal Euthanasia (CFMV, 2013).

After euthanasia and weighing on an analytical precision balance (Bel M214-AI, Bel Engineering, SP, Brazil), a midline laparotomy was performed to expose and remove the testis-epididymis complexes (Figure 1), which were rinsed in saline solution (0.9% NaCl) and placed in beakers containing gauze moistened with saline solution for transport to the laboratory. The testis-epididymis complexes were dissected to remove surrounding tissues, and the ducts were isolated and separated into the different regions: caput, corpus and cauda of the epididymis.

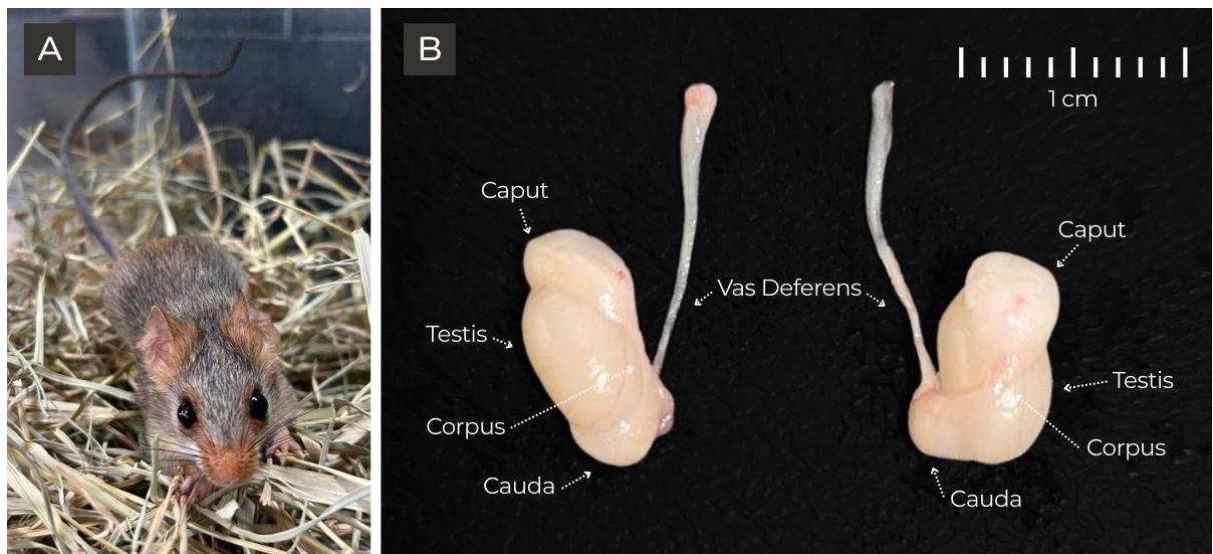


Figure 1. A) Red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*). B) Red-nosed-mouse testis-epididymis complexes.

Spermatozoa from each epididymal region were recovered using the *slicing* technique, as described by Tourmente *et al.* (2022). Each region was placed in a Petri dish containing 200 μ L of Tris-based medium [3.028g of Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, 1.78g of citric acid monohydrate, and 1.25g of D-fructose dissolved in 100mL ultrapure water; 295mOsm/L, pH 6.8] (Silva *et al.*, 2018), pre-warmed to 37°C. The immersed tissues were incised, allowing spermatozoa to be released into the medium. After 5 minutes, sperm suspensions were collected using micropipettes, and the recovered volume was transferred to labeled microtubes. The samples were immediately assessed for sperm concentration, kinetic patterns using computer-assisted sperm analysis (CASA), chromatin integrity, structural integrity of the plasma membrane, sperm morphology, and ultrastructural evaluation by scanning electron microscopy.

2.3. Sperm evaluation

Immediately after recovery, the samples were submitted to evaluation. The volume recovered from each epididymal segment was measured using a single-channel adjustable-volume micropipette (20-200 μ L, LabMate Pro). Epididymal sperm concentration (sperm/mL) was measured after dilution (1:200) of the samples in buffered formalin-saline solution and assessed using a standard Neubauer counting chamber (Buranaamnuay *et al.*, 2022). To obtain the total number of sperm recovered, volume was multiplied by the respective sperm concentration (Dantas *et al.*, 2022).

Chromatin integrity was evaluated using toluidine blue staining, according to Krzanowska (1982). An aliquot (10 μ L) of each sample was smeared on a microscope slide and fixed in ethanol-acetic acid solution (3:1) for 1 min, followed by fixation in 70% ethanol for 3 min. Subsequently, the slides were immersed in 4 M HCl solution for 25 min, rinsed in distilled water, and air-dried at room temperature. Then, 5 μ L of toluidine blue solutions was applied, coverslips were placed, and the slides were examined under a bright-field optical microscope at 1000 $\times$ magnification. A total of 500 cells were counted, and spermatozoa lightly stained in pale blue were classified as normal, whereas those stained dark blue/purple were classified as abnormal or with altered chromatin.

Sperm viability was determined by assessing plasma membrane integrity using a combination of the fluorescent probes Hoechst 33342 and propidium iodide. An aliquot of each sample (5 μ L) was incubated with 2 μ L of Hoechst 33342 (40 μ g/mL in DPBS) for 10 min at 37°C, followed by addition of 3 μ L of propidium iodide (0,5mg/mL in DPBS). After 8 min, preparations were mounted on glass slides, covered with coverslips and evaluated under epifluorescence microscopy at 1000 $\times$ magnification (Balbach *et al.*, 2020). A total of 200 spermatozoa were analyzed, classifying those stained with propidium iodide (red) as non-viable due to plasma membrane degeneration, and those stained only with Hoechst (blue) as viable with intact membranes.

2.4. Sperm kinetics parameters

Kinetic patterns were evaluated using computer-assisted sperm analysis (CASA; IVOS 12.0, Hamilton-Thorne, Beverly, MA, USA). An aliquot (3 μ L) of each sample was placed in a pre-warmed microscope chamber (37°C) and examined under a phase-contrast microscope equipped with a digital capture camera. The software was configured according to a predefined

setup for mouse spermatozoa, as reported in the HTM- IVOs Installation and Getting Started Guide Version 14.0 (2011). The following settings were used: frame rate (Hz): 60; minimum contrast: 30; minimum cell size (pixels): 4; straightness (%): 50; VAP cutoff (μs): 10; VSL cutoff (μs): 0; slide warmer temperature: 37; field selection mode: manual. Five microscopic fields were randomly selected for evaluation of total motility (MOT, %) and progressive motility (MOP, %), as well as trajectory parameters: average path velocity (VAP, $\mu\text{m/s}$), straight-line velocity (VSL, $\mu\text{m/s}$), curvilinear velocity (VCL, $\mu\text{m/s}$), amplitude of lateral head displacement (ALH, μm), beat cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %) and linearity (LIN, %).

2.5. Morphological and morphometric analysis

Sperm morphology was evaluated using wet preparations, in which 5 μL of each sample was mixed with 45 μL of Rose Bengal solution between a slide and coverslip, and examined under bright-field light microscopy at 1000 $\times$. A total of 200 spermatozoa were counted and classified as morphologically normal or defective (Silva *et al.*, 2018). Sperm morphometry was assessed by capturing images of morphologically normal cells at 1000 $\times$ magnification under light microscopy coupled to a digital camera. Measurements were performed using ImageJ software, according to Rossi *et al.* (2018). The following dimensions were analyzed: head length and width (longitudinal and transverse axes of maximum diameter), midpiece length (from the base of the head to annulus), tail length (from the annulus to the end of flagellum) and total length (from the acrosomal apex to the end of flagellum).

2.6. Ultrastructural analysis by scanning electron microscopy (SEM)

For ultrastructural analysis by scanning electron microscopy, the methodology described by Cong *et al.* (2021) was used. Sperm suspensions from the cauda epididymis were fixed in 2.5% phosphate-buffered glutaraldehyde pH 7.2. For processing, the samples were initially centrifuged at 800 $\times g$ for 10 minutes to obtain a cell pellet. The pellet was subjected to three washes with 0.2 M phosphate buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide. Subsequently, the samples were dehydrated in increasing concentrations of ethanol (50%, 70%, 90% and 100%). Finally, the material was coated with gold by *sputtering* for observation under a scanning electron microscope (Tescan®, Type VEGA 3 LMU, N° VG13671479, 50/60 Hz;

Brno, Czech Republic). The samples were then processed for evaluation by SEM in the laboratory of the Center for Research in Plant Sciences of the Semiarid (CPVSA/UFERSA).

2.7. Statistical analysis

All results were expressed as mean $\pm$ standard error. Statistical analysis was performed using GraphPad 8.0.2 (Dotmatics, Boston, MA, USA), considering a significance level of $P < 0.05$. Data normality was assessed using Shapiro-Wilk test, and homoscedasticity was evaluated with Bartlett's test. Parameters for chromatin integrity, total motility, progressive motility, curvilinear velocity, rapid and slow subpopulations, and sperm morphology across different epididymal regions (caput, corpus and cauda) were compared using Kruskal-Wallis test, while all other parameters were analyzed by ANOVA followed by Tukey's *post-hoc* test.

3. Results

3.1. Sperm evaluation

Parameters of spermatozoa recovered from each epididymal region are presented in Table 1. Significant differences were observed between regions for volume, concentration and total number of sperm. The epididymal corpus yielded a lower volume compared to caput and cauda ($P < 0.05$), and the highest sperm concentration was observed in cauda, with $31.4 \pm 9.9 \times 10^6$ total sperm recovered ($150.0 \pm 34.3 \times 10^6$ sperm/mL). Regarding functional parameters, the chromatin integrity increased progressively along epididymal transit, with highest percentages in corpus ($84.7 \pm 4.4\%$) and cauda ($92.5 \pm 2.5\%$). However, sperm viability did not differ significantly between the different regions.

The kinetic analysis of red-nosed-mouse sperm showed that, although the descriptive values indicated a tendency toward higher means of total and progressive motility in the cauda (87.6 ± 2.5 and 32.3 ± 4.2 , respectively) compared to the caput and corpus, no statistically significant differences were observed between the epididymal regions ($P > 0.05$; Table 2). Similarly, trajectory parameters (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR and LIN) did not differ between regions. Regarding subpopulations, there was a tendency toward a higher proportion of rapid sperm and a lower percentage of static cells in the cauda, although without statistical significance.

Table 1. Mean ($\pm$ SE) of sperm parameters from spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*; n=7).

Parameter	Epididymal regions		
	Caput	Corpus	Cauda
Volume (μ L)	174.7 $\pm$ 13.7 ^{ab}	123.7 $\pm$ 10.0 ^b	188.6 $\pm$ 22.6 ^a
Concentration ($\times 10^6$ sperm/mL)	42.9 $\pm$ 6.1 ^b	23.0 $\pm$ 6.4 ^b	150.0 $\pm$ 34.3 ^a
Number of sperm ($\times 10^6$ sperm)	7.3 $\pm$ 1.0 ^b	3.0 $\pm$ 0.8 ^b	31.4 $\pm$ 9.9 ^a
Chromatin integrity (%)	62.9 $\pm$ 5.2 ^b	84.7 $\pm$ 4.4 ^{ab}	92.5 $\pm$ 2.5 ^a
Viability (%)	48.4 $\pm$ 9.8	45.3 $\pm$ 9.9	56.0 $\pm$ 11.9

^{a,b} Different uppercase letters indicate statistically significant differences between epididymal regions (caput, corpus and cauda) during ductal transit for each parameter ($P < 0.05$).

Table 2. Mean ($\pm$ SE) of kinetic parameters of spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*; n=7).

Kinetic parameters	Epididymal regions		
	Caput	Corpus	Cauda
Total motility (%)	71.3 $\pm$ 10.4	69.6 $\pm$ 10.2	87.6 $\pm$ 2.5
Progressive motility (%)	18.9 $\pm$ 3.3	23.1 $\pm$ 7.5	32.3 $\pm$ 4.2
Average path velocity (VAP; μ m/s)	69.7 $\pm$ 12.3	77.2 $\pm$ 15.1	70.1 $\pm$ 5.1
Straight line velocity (VSL; μ m/s)	41.3 $\pm$ 8.5	48.9 $\pm$ 13.5	43.9 $\pm$ 5.2
Curvilinear velocity (VCL; μ m/s)	148.3 $\pm$ 21.8	171.7 $\pm$ 28.8	143.5 $\pm$ 9.7
Amplitude of lateral head displacement (ALH; μ m)	10.1 $\pm$ 0.7	10.3 $\pm$ 1.9	9.2 $\pm$ 0.4
Beat cross frequency (BCF; Hz)	34.3 $\pm$ 2.9	25.9 $\pm$ 5.1	35.1 $\pm$ 1.6
Straightness (STR; %)	52.7 $\pm$ 3.8	54.1 $\pm$ 6.7	54.1 $\pm$ 2.9
Linearity (LIN; %)	25.9 $\pm$ 2.5	24.4 $\pm$ 4.1	27.9 $\pm$ 1.6
Subpopulations			
% of Rapid sperm	38.4 $\pm$ 8.0	36.3 $\pm$ 8.6	49.6 $\pm$ 4.0
% of Medium velocity sperm	31.4 $\pm$ 10.3	30.1 $\pm$ 9.2	40.3 $\pm$ 2.5
% of Slow sperm	9.7 $\pm$ 4.1	4.9 $\pm$ 2.5	1.4 $\pm$ 0.4
% of Static sperm	20.3 $\pm$ 8.4	28.4 $\pm$ 11.3	8.7 $\pm$ 2.9

* No statistical difference was observed in evaluated parameters between the epididymal regions ($P > 0.05$).

3.2. Morphological and morphometric analysis

The spermatozoa of red-nosed-mouse were described as an elongated head with a hook-shaped acrosome, with a clear demarcation of the post-acrosomal region, and a filamentous tail that thins distally. Morphological evaluation revealed an increase in percentage of normal spermatozoa along the epididymal duct, with a significantly higher percentage ($P < 0.05$) observed in the cauda region ($94.2 \pm 0.9\%$) (Table 3). The most frequent abnormalities found were detached heads, folded tail and cytoplasmic droplets. Figure 2 shows morphologically normal spermatozoon and some of the sperm defects found.

Table 3. Mean ($\pm$ SE) of sperm morphology in spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*; n=7).

Sperm morphology (%)	Epididymal regions		
	Caput	Corpus	Cauda
Normal spermatozoa	89.3 $\pm$ 1.1 ^b	89.2 $\pm$ 1.4 ^b	94.2 $\pm$ 0.9 ^a
Abnormal spermatozoa	10.7 $\pm$ 1.1 ^a	10.8 $\pm$ 1.4 ^a	5.8 $\pm$ 0.9 ^b
Acrosome defects	13,5	19,6	9,2
Abnormal acrosome	1.1 $\pm$ 0.3	1.5 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0
Detached acrosome	1.2 $\pm$ 0.3	1.8 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.0
Head defects			
Microcephaly	0.0 $\pm$ 0.0	1.2 $\pm$ 0.4	0.5 $\pm$ 0.0
Macrocephaly	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Double head	0.5 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
Detached head	2.9 $\pm$ 0.4	2.8 $\pm$ 0.7	1.8 $\pm$ 0.2
Fusiform head	0.0 $\pm$ 0.0	0.5 $\pm$ 0.0	0.7 $\pm$ 0.2
Midpiece defects			
Folded midpiece	1.1 $\pm$ 0.3	4.0 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.2
Proximal cytoplasmic droplet	1.8 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.0
Distal cytoplasmic droplet	0.5 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.5
Tail defects			
Folded tail	2.0 $\pm$ 0.6 ^{ab}	2.9 $\pm$ 0.2 ^a	1.3 $\pm$ 0.3 ^b
Coiled tail	1.9 $\pm$ 0.3	1.7 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.3
Double tail	0.5 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0

^{a,b} Different uppercase letters indicate statistically significant differences between epididymal regions (caput, corpus and cauda) for each parameter ($P < 0.05$).

Sperm morphometry (Table 4) revealed significant differences among the epididymal regions ($P < 0.05$). Head length and width showed a progressive reduction in caput-corpus-cauda direction ($7.93 \pm 0.04 \mu\text{m}$ and $4.13 \pm 0.02 \mu\text{m}$ in caput; $7.47 \pm 0.06 \mu\text{m}$ and $3.88 \pm 0.03 \mu\text{m}$ in corpus; $7.34 \pm 0.02 \mu\text{m}$ and $3.65 \pm 0.01 \mu\text{m}$ in cauda). Midpiece length remained similar between caput and corpus, but was significantly reduced in the cauda ($18.76 \pm 0.03 \mu\text{m}$). Tail length remained constant between caput and cauda, and total sperm length showed a significant reduction in the cauda ($94.11 \pm 0.15 \mu\text{m}$).

1.1. Ultrastructural analysis by scanning electron microscopy (SEM)

Scanning electron microscopy (SEM) provided a detailed visualization of sperm morphology, revealing a hook-shaped acrosome and an oval head with a smooth surface. The sperm head-midpiece coupling apparatus was also observed, along with a narrowing of the sperm neck, implanted slightly laterally to the head, and a midpiece surrounded by a fibrous sheath (Figure 3A). In addition, images of spermatozoa with cytoplasmic droplets in midpiece

were captured (Figure 3B). Figure 3C provides an overview of the spermatozoon, highlighting the head, midpiece and tail segments.



Figure 2. Photomicroscopy of red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*) epididymal sperm. **A)** Morphologically normal sperm; **B)** Folded tail; **C)** Coiled tail; **D)** Fusiform head; **E)** Detached acrosome.

Table 4. Mean ($\pm$ SE) of morphometric parameters of spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*; n=7).

Measurements (μm)	Epididymal regions		
	Caput	Corpus	Cauda
Head length	7.93 ± 0.04^a	7.47 ± 0.06^b	7.34 ± 0.02^c
Head width	4.13 ± 0.02^a	3.88 ± 0.03^b	3.65 ± 0.01^c
Midpiece length	19.20 ± 0.03^a	19.10 ± 0.04^a	18.76 ± 0.03^b
Tail length	67.44 ± 0.19^a	68.75 ± 0.19^b	67.41 ± 0.13^a
Total length	97.49 ± 0.20^a	97.20 ± 0.20^a	94.11 ± 0.15^b

^{a,b} Different uppercase letters indicate statistically significant differences between epididymal regions (caput, corpus and cauda) for each measurement.

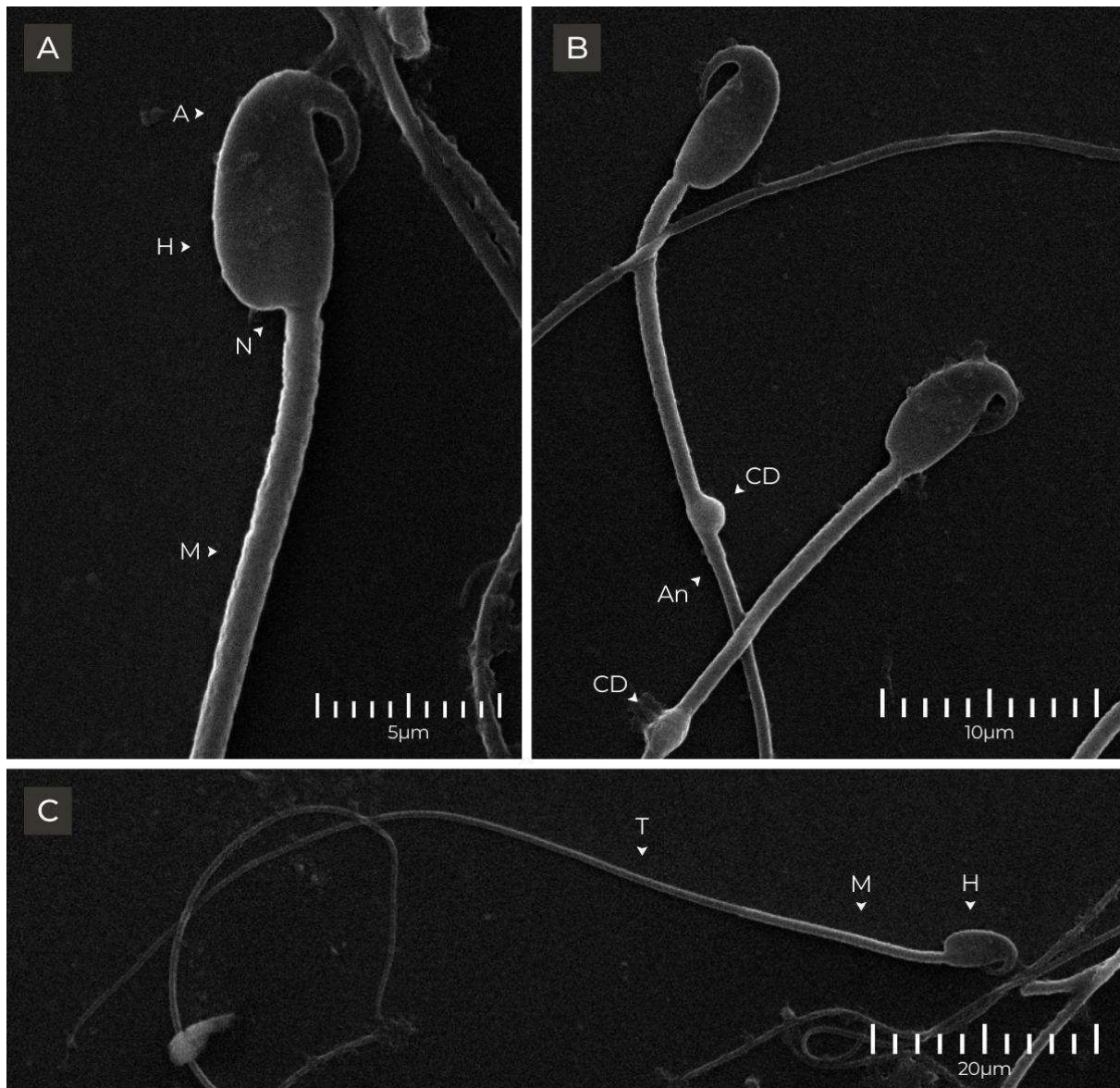


Figure 3. Electron micrograph of sperm morphology of red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*). **A.** Highlight the head of the spermatozoon, visualizing A – Acrosome; H – Head; N – spermatic Neck; and M – Midpiece. **B.** Epididymal spermatozoa of red-nosed-mouse with cytoplasmic droplets (CD) in SEM, also visualizing the Annulus (An) of the spermatozoon. **C.** Visualization of sperm segments, in H – Head; M – Midpiece; and T – Tail.

2. Discussion

To our knowledge, this is the first study to provide a detailed description of the morphofunctional parameters and regional-specific characteristics during epididymal transit of red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*) sperm. Our findings demonstrate that spermatozoa undergo progressive maturation as they move through the epididymal duct, with structural and

functional improvements. Moreover, we provide unprecedented information regarding the characterization of sperm parameters of the species, whose natural habitat is under continuous anthropogenic threats, and may support future conservation strategies.

From sperm recovery, differences in volume and concentration were observed between the different epididymal segments, with lower volumes obtained from the corpus compared to caput and cauda, and the highest sperm concentrations in the cauda. Comparable patterns have been reported in other cricetid rodents such as the golden hamster (*Mesocricetus auratus*; Kann and Serres, 1980; Weissenberg *et al.* 1994; Sudarshani and Wegiriya, 2022), and also in wild species such as the dasiproctid red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*; Dantas *et al.*, 2022). This feature is consistent with the primary function of the distal epididymal region as a sperm reservoir, and with the epididymal secretions, that provide an adequate luminal environment for maintaining sperm fertility during storage (Marchiani *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2018).

Regarding functional parameters, sperm viability remained constant throughout epididymal transit, suggesting that the maturation process does not substantially compromise membrane integrity. In contrast, chromatin integrity improved progressively, with the highest values observed in corpus and cauda spermatozoa. These results corroborate with the nuclear stabilization that occurs during epididymal passage, due to the oxidation of thiol-groups of protamines and the DNA compaction (Bedford and Calvin, 1974; Hernández-Ochoa *et al.*, 2006; Champroux *et al.*, 2016). Similar results have been reported in golden hamster by Weissenberg *et al.* (1994), where caudal sperm display superior DNA integrity compared to caput sperm. The improvement in chromatin quality has important implications for sperm survival and successful fertilization, as it ensures genomic stability, which is relevant for natural reproduction and particularly important for assisted reproduction efforts in wild species (Marchiani *et al.*, 2017; Balder *et al.*, 2024).

Although descriptive values of kinetic parameters indicated a tendency toward higher total and progressive motility in the cauda, no statistically significant differences were detected between regions. This finding may be related to sample variability or suggest that red-nosed-mouse spermatozoa acquire motility competence early during maturation. In the golden hamster, spermatozoa remain largely immotile in proximal regions and only acquire the ability to swim progressively as they advance toward the cauda (Yeung *et al.*, 1994; Weissenberg *et al.*, 1994). But previous observations in mice (*Mus musculus*) and rat (*Rattus norvegicus*) spermatozoa show that they already reach motility levels above 60% in proximal epididymal segments (Yeung *et al.*, 1992; Soler *et al.*, 1994). Therefore, despite belonging to different

families of rodents, the acquisition of sperm motility in *W. pyrrhorhinos* more closely resembles that of murine rodents than that of the cricetid model.

The proportion of morphologically normal sperm increased significantly toward the cauda, where more than 90% of cells were classified as normal, being similar to what is found in caudal epididymis of the domestic hamster, and reflects the epididymal role in eliminating defective sperm and remodeling cell structure to optimize fertilizing capacity (Sudarshani and Wegiriya, 2022). The most frequent defects observed were detached heads, folded tails and cytoplasmic droplets, that are often reported in epididymal spermatozoa of rodents (Weissenberg *et al.*, 1994; Dantas *et al.*, 2022). These abnormalities are usually associated with incomplete maturation and persistence of residual cytoplasmic material, which is shed throughout epididymal transit and upon ejaculation (Kirichok and Lishko, 2011; Sudarshani and Wegiriya, 2022). Additionally, the elevated proportion of detached heads in our samples may also result from mechanical stress caused by the *slicing* recovery technique, in which the epididymis is incised and potentially compromise sperm integrity.

Morphometric changes along the epididymal transit reflect a progressive structural remodeling, associated with sperm maturation. A gradual reduction in head length and width from the caput to the cauda suggests the phenomenon of chromatin condensation that occur during epididymal transit (Manfredi Romanini *et al.*, 1986; Alves *et al.*, 2018), and is associated with the increased chromatin integrity observed in functional sperm evaluation. Similar pattern in head and tail dimensions was also reported in agouti, with reduction of sperm measurements along the caput-corpus-cauda direction (Dantas *et al.*, 2022). Overall, the measurements in red-nosed-mouse were comparable to those of other rodent groups, such as Rhizomyinae and Zapodinae families (Breed *et al.* 2014), although the phylogenetically related *Neotoma goldmani* presents a greater total sperm length than *Wiedomys* (León-tapia and Cervantes, 2019).

The *W. pyrrhorhinos* spermatozoa exhibit a morphology pattern consistent with that of other cricetid rodents, bearing the closest resemblance to domestic hamster (*Cricetus cricetus* and *Mesocricetus auratus*; Breed *et al.*, 2014) and to Goldman's Diminutive Woodrat (*Nelsonia goldmani*; León-Tapia and Cervantes, 2019), with an elongated and smooth oval head, a hook-shaped acrosome, an asymmetric head-midpiece implantation and a filamentous tail. These features were confirmed by SEM analysis, which provided detailed ultrastructural visualization of the segments. Comparable morphologies have also been described for Muridae and Nesomyidae families, although considerable diversity exists in head and acrosome shapes between the species (Breed *et al.*, 2014; León-Tapia and Cervantes, 2019; Gu *et al.*, 2019). In

contrast, phylogenetically basal species in the Muroidea superfamily lineage, such as the Spalacidae, Dipodidae and Peditidae families, has a non-hooked sperm head, suggesting that the apical hook evolved after the divergence from a common ancestor of the Nesomyidae family (Breed *et al.*, 2014).

Descriptions of sperm morphology have long been recognized as a useful tool for taxonomy and evolutionary research, as some genera and species exhibit highly distinctive sperm characteristics, which is particularly valuable in wild animals where biological samples are limited, and offers important insights into patterns of rodent diversity (León-Tapia and Cervantes, 2019). Our results support the idea that the study of sperm morphology in Muroidea is not only important for understanding reproductive biology, but also provide a valuable approach for investigating interspecies relationships and the evolution of this highly diverse superfamily.

3. Conclusion

This study deepens the knowledge of reproductive biology in *W. pyrrhorhinos* by describing the sperm maturation in the species for the first time, with progressive structural and functional improvements along the epididymis. These findings are consistent with those reported for phylogenetically related species, such as the domestic hamster, but we also emphasize the differences and relationships with other Muroidea families, particularly regarding the acquisition of sperm motility similar to mice and rat, and the interspecies comparisons of sperm morphology. In this context, understanding species-specific reproductive physiology is relevant due to the ecological pressures in the Caatinga biome, where habitat loss and climate changes threaten wildlife populations. Therefore, we contributed by providing data that can support the development of reproductive biotechnologies in *ex situ* conservation strategies for the red-nosed-mouse and other small mammals of the Caatinga.

Acknowledgements

Authors would like to thank Center of Wild Animals Multiplication (CEMAS/UFERSA) for providing the red-nosed-mouse specimens used in the experiment.

Ethics statement

This research was conducted ensuring health and welfare of the animals, with approval from the Ethics Committee for the Use of Animals in Experimentation at UFERSA (CEUA UFERSA: 37/2025) and authorized by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio SISBIO No. 84083-1).

Financial support

This study was financed, in part, by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES, Financial Code 001). MF Oliveira and AR Silva are researchers at the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq).

Author contribution

YGM, AMS and ARS contributed to the conceptualization of the study. YGM, RPS, AMD, LGPB, PAPB, GSCB and REMO executed the experiment and analysis. MFO and ARS were involved in the investigation and resource management. YGM and RPS contributed to data analysis. YGM was responsible for writing the original draft of the manuscript. ARS reviewed and edited the manuscript and managed the project administration. All authors have read and approved the final manuscript.

Declaration of conflict of interests

Authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability statement

Data that support the findings of this study are available from the authors upon request.

References

- Alves IP, Cancelli CHB, Grassi TLM, Oliveira PRH, Franciscato DA, Carreira JT, Koivisto MB (2018) Evaluation of sperm head dimensions and chromatin integrity of epididymal sperm from domestic cats using the toluidine blue technique. *Animal Reproduction Science* **197**, 33-39.
- Balbach M, Gervasi MG, Hidalgo DM, Visconti P, Levin LR, Buck J (2020) Metabolic changes in mouse sperm during capacitation. *Biology of Reproduction* **103**, 4, 791-801.
- Balder P, Jones C, Coward K, Yeste M (2024) Sperm chromatin: evaluation, epigenetic signatures and relevance for embryo development and assisted reproductive technology outcomes. *European Journal of Cell Biology* **103**, 3, 151429.
- Barbosa TA, Filho RRG (2022) Biodiversidade e conservação da Caatinga: revisão sistemática. *Journal of Environmental Analysis and Progress* **7**, 4, 177-189.
- Bedford JM, Calvin HI (1974) The occurrence and possible functional significance of -S-S- crosslinks in sperm heads, with particular reference to eutherian mammals. *Journal of Experimental Zoology* **188**, 137-155.
- Breed WG, Leigh CM, Aplin KP, Shahin AAB, Avenant NL (2014) Morphological Diversity and Evolution of the Spermatozoon in the Mouse-Related Clade of Rodents. *Journal of Morphology* **275**, 540-547.
- Buranaamnuay K (2022) The effect of cryopreservation media on the quality of β -thalassemia mouse spermatozoa. *Open Veterinary Journal* **12**, 5, 602.
- Castelo TS, Silva AM, Peixoto GCX, Souza ALP, Campos LV, Lima GL, Dantas MRT, Souza-Junior JBF, Silva AR (2023) Cryopreservation efficiency of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*) sperm obtained from different origins through epididymal retrograde flushing or electroejaculation. *Cryobiology* **113**, 104787.
- CFMV (2013) Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais: Conceitos e Procedimentos Recomendados. Brasília: CFMV, 66p.
- Champroux A, Carreira JT, Gharagozloo P, Drevet JR, Kocer A (2016) Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic and Clinical Andrology* **26**, 17.
- Cong J, Wang X, Amiri-Yekta A, Wang L, Kherraf Z, Liu C, Cazin C, Tang S, Hosseini SH, Tian S (2021) Homozygous mutations in CCDC34 cause male infertility with oligoasthenoteratozoospermia in humans and mice. *Journal of Medical Genetics* **59**, 7, 710-718.
- Cunha-Filho CA (2019) Implicações taxonômicas e biogeográficas da variação morfológica em Wiedomys (Rodentia, Sigmodontinae). PhD Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.
- Dantas MRT, Silva AM, Bezerra LGP, Pereira AG, Luz NRN, Souza-Junior JBF, Oliveira MF, Silva AR (2022) Morphological, morphometric, ultrastructural, and functional evaluation of

- red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) sperm during epididymal transit. *Animal Reproduction Science* **243**, 107029.
- Faria MB, Kaizer MC (2020) Pequenos mamíferos não-voadores (Didelphimorphia e Rodentia): estudo de impacto ambiental em uma região de ecótono entre a Mata Atlântica e a Caatinga. *Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia* **89**, 74-82.
- Gu N, Zhao W, Wang G, Sun F (2019) Comparative analysis of mammalian sperm ultrastructure reveals relationships between sperm morphology, mitochondrial functions and motility. *Reproductive Biology and Endocrinology* **17**, 66.
- Hernández-Ochoa I, Sánchez-Gutiérrez M, Solís-Heredia MJ, Quintanilla-Veja B (2006) Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation. *Reproductive Toxicology* **21**, 171-178.
- Kann M-L, Serres C (1980) Development and initiation of sperm motility in the hamster epididymis. *Reproduction Nutrition Development* **20**, 6, 1739-1749.
- Kirichok Y, Lishko PV (2011) Rediscovering sperm ion channels with patch-clamp technique. *Molecular Human Reproduction* **17**, 8, 478-499.
- Krzanowska H (1982) Toluidine blue staining reveals changes in chromatin stabilization of mouse spermatozoa during epididymal maturation and penetration of ova. *Journal of Reproduction and Fertility* **64**, 1, 97-101.
- Leal IR, Silva JMC, Tabarelli M, Lacher Jr TEL (2005) Mudando o curso da conservação da biodiversidade na Caatinga. *Megadiversidade* **1**, 1.
- León-Tapia MA, Cervantes FA (2019) First contribution to the description of reproductive structures of *Nelsonia goldmani* (Rodentia: Cricetidae). *Therya* **10**, 2, 155-160.
- Manfredi Romanini MG, Biggiogera M, Formenti D, Fraschini A, Garagna S, Pellicciari C, Redi CA (1986) Sperm-chromatin maturation in the mouse - A cytochemical approach. *Histochemistry and Cell Biology* **84**, 484-491.
- Mangan SA, Adler GH (2000) Consumption of arbuscular mycorrhizal fungi by terrestrial and arboreal small mammals in a Panamanian cloud forest. *Journal of Mammalogy* **81**, 563-570.
- Marchiani S, Tamburrino L, Muratori M, Baldi E (2017) Epididymal sperm transport and fertilization. In: 'Endocrinology of the testis and male reproduction'. (Eds Simoni M, Huhtaniemi IT) pp.365-383. (Cham: Springer International Publishing).
- Moura MR, Oliveira GA, Paglia AP, Pires MM, Santos BA (2023) Climate change should drive mammal defaunation in tropical dry forests. *Global Change Biology*, **29**, 6931–6944.
- Reilly JN, McLaughlin EA, Stanger SJ, Anderson AL, Hutcheon K, Church K, Mihalas BP, Tyagi S, Holt JE, Eamens AL (2016) Characterisation of mouse epididymosomes reveals a complex profile of microRNAs and a potential mechanism for modification of the sperm epigenome. *Scientific Reports* **6**, 31794.

- Rossi LF, Lasancha N, Luaces JP, Estevez D, Merani M (2018) Morphological description and comparison of sperm from eighteen species of cricetid rodents. *Journal of Mammalogy* **99**, 6, 1398-1404.
- Silva AM, Praxedes ECG, Campos LB, Bezerra LGP, Moreira SSJ, Maia KM, Souza ALP, Silva AR (2018) Epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies sperm successfully cryopreserved in Tris extender with 6% glycerol and 20% egg yolk. *Animal Reproduction Science* **191**, 64-69.
- Sobral G, Oliveira JA (2014) Annual age structure and reproduction in the Caatinga red-nosed mouse *Wiedomys pyrrhorhinos*. *Therya* **5**, 2, 509-534.
- Soler C, Yeung, CH, Cooper TG (1994) Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *International Journal of Andrology* **17**, 271-278.
- Sudarshani KAM, Wegiriya HCE (2022) An investigation on cauda storage of sperm in hamster epididymis. *Animal Biology* **72**, 367-383.
- Tourmente M, Sanchez-Rodriguez A, Roldan ERS (2022) Effect of Motility Factors D-Penicillamine, Hypotaurine and Epinephrine on the Performance of Spermatozoa from Five Hamster Species. *Biology* **11**, 4, 526.
- Weissenberg R, Yossefi S, Oschry Y, Madgar I, Lewin LM (1994) Investigation of epididymal sperm maturation in the golden hamster. *International Journal of Andrology* **17**, 256-261.
- Yeung CH, Oberlander G, Cooper TG (1994) Maturation of hamster epididymal sperm motility and influence of the thiol status of hamster and rat spermatozoa on their motility patterns. *Molecular Reproduction and Development* **38**, 347-355.
- Zhou W, Iuliis GN, Dun MD, Nixon B (2018) Characteristics of the epididymal luminal environment responsible for sperm maturation and storage. *Frontiers in Endocrinology* **9**, 59.

CAPÍTULO II

Regional assessment of epididymal sperm membrane function using the Hypoosmotic Swelling Test in red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*)

Periódico: Reproduction in Domestic Animals (Não submetido)

QUALIS: A2

Fator de Impacto: 1.7

[Original research paper]:

Regional assessment of epididymal sperm membrane function using the Hypoosmotic Swelling Test in red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*)

Yuri Gonçalves Matos¹, Ana Glória Pereira¹, Romário Parente dos Santos¹, Tayná Moura Matos¹, Yasmim Carla da Silva Cavalcante¹, Lilian Leal Dantas¹, Moacir Franco de Oliveira², Alexandre Rodrigues Silva^{1*}

¹Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

²Center of Wild Animals Multiplication (CEMAS), Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

*Corresponding author: alexrs@ufersa.edu.br (AR Silva). Laboratory of Animal Germplasm Conservation (LCGA), Department of Animal Sciences, Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), 59625-900, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brazil.

Abstract

The red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*) is a typical rodent of the Caatinga, whose density population is vulnerable to anthropogenic threatens. To date, sperm maturation in species have been analyzed based only on classic parameters, and the use of HOST has not yet been validated. Understanding how sperm acquire functional competence along the epididymal duct is crucial for characterizing its reproductive biology. Therefore, this study aims to establish the ideal osmolarity to validate the HOST in *W. pyrrhorhinos* and to evaluate sperm membrane functionality throughout the epididymal maturation. Eight adult males, weighing 41.7 ± 4.2 g and 6.3 ± 0.9 months old, were used for sperm recovery from caput, corpus and cauda of the epididymis. Samples were assessed for volume, concentration, kinetic patterns and viability, while membrane functionality was tested using distilled water (0mOsm/L) and fructose-based solutions (50 and 100mOsm/L). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism ($P < 0.05$). All results were expressed as mean $\pm$ standard error. Motility and viability showed no significant differences between epididymal regions, indicating that these parameters alone were insufficient to detect subtle changes during sperm maturation. However, HOST revealed pronounced increase in osmotic responsiveness, particularly with the incubation at 50mOsm/L ($80.3 \pm 2.8\%$ in epididymal cauda). Additionally, exhibited a strong positive correlation with total motility ($\rho = 0.82$), indicating a tightly association between membrane osmotic capacity and the maturation of kinetic characteristics. Therefore, we suggest the 50mOsm/L fructose solution as the most meaningful for the HOST in *W. pyrrhorhinos*, which enabled the observation of a progressive increase in sperm membrane functional integrity throughout the epididymal maturation.

Keywords: rodent, Caatinga, epididymis, sperm maturation, plasma membrane.

1. Introduction

The red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*) is a sigmodontine rodent endemic to the Caatinga biome. As a species highly sensitive to habitat disturbance, its population dynamics reflects environmental changes, serving as a bioindicator of environmental health (Faria and Kaizer, 2020). Beyond their role in ecological monitoring, these small mammals perform as dispersal of seeds and mycorrhizal fungi, and contribute to stability of predator-prey balance in the food chain (Mangan and Adler, 2000). However, increasing anthropogenic threats and habitat fragmentation have led the species currently to suffers from geographic discontinuities and isolation of local groups (Sobral and Oliveira, 2014; Cunha-Filho, 2019). In this context, understanding the physiology of *W. pyrrhorhinos* is fundamental for developing effective conservation strategies, but despite this importance, knowledge regarding its reproductive biology remains remarkably scarce.

In mammals, the acquisition of fertilizing capacity is a complex process that occurs during epididymal transit. As spermatozoa travel through the caput, corpus and cauda of the epididymis, they undergo biochemical and structural remodeling, that involves changes in composition and reorganization of proteins, lipids and glycoproteins (Jones, 1998; Soler *et al.*, 2017). This maturation is essential for the plasma membrane to achieve the functional state required to mediate metabolic exchanges between intracellular medium and its surrounding environment. Consequently, assessing membrane functionality, when combined with conventional semen evaluation, provides a more accurate description of sperm maturation in species and enables a more precise estimation of the fertility potential (Lebouef *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2013).

To date, semen analysis in *W. pyrrhorhinos* has been restricted to classical descriptive parameters, and assessment of plasma membrane have focused mainly on structural integrity (Brito *et al.*, 2025). Functional assays, regarding osmotic functionality of sperm membrane, is still lacking, and the adoption of complementary techniques could enhance the evaluation of sperm quality in species and deepens the knowledge of the dynamic changes in membrane competence during sperm maturation.

Although widely used in domestic species (Kumi-Diaka, 1993, Fonseca *et al.*, 2001, Lechniak *et al.*, 2002, Martins *et al.*, 2011), the application of hypoosmotic swelling test (HOST) in wild mammals is still limited, largely because sperm osmotic behavior is species-specific, and the reliable interpretation depends on determining the appropriate hypoosmotic solution, which is often unknown (Melo *et al.*, 2003; Matson *et al.*, 2009). In murine, sperm are

typically assessed using distilled water (0 mOsm/L; Silva *et al.*, 2011), while chinchillids and caviids respond better to HOST with a 100 mOsm/L solution (Ponce *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2017), and dasyproctid show more reliable results with an intermediate osmolality of 50 mOsm/L, yielding over 80% reactivity in cauda epididymal sperm (Dantas *et al.*, 2022).

To our knowledge, the standardization of the HOST for *Wiedomys* species has not yet been established, and the dynamics of membrane functional integrity during epididymal transit remain uncharacterized. Therefore, this study aims to establish the ideal hypoosmotic solution to validate the HOST for *W. pyrrhorhinos* sperm, and to investigate the acquisition of membrane functionality along the epididymal maturation process, correlating these changes with other sperm metrics.

2. Material and methods

2.1. Animals

The experimental protocols were approved by the Animal Ethics Committee of the Federal Rural University of the Semi-Arid (CEUA/UFERSA: No. 37/2025) and authorized by the Brazilian Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio/SISBIO No. 84083-1). The procedures were conducted in accordance with current international animal welfare guidelines. Animals were obtained from the Center of Wild Animals Multiplication (CEMAS/UFERSA, Mossoró, RN, Brazil, 5°10'S 37°10'W), registered with IBAMA as a scientific breeding (No. 1478912), where programmed slaughter is conducted annually to population control and the specimens are destined for scientific purposes, as those provided in the present study.

Eight pubescent male animals were used, weighing 41.7 ± 4.2 g, with an average age of 6.3 ± 0.9 months. Animals were fed daily with a diet consisting of specific rodent chow, fruit, soybeans, mature corn and water was available *ad libitum*. Experimental collections were carried out between June and August 2023, during dry season in the Caatinga, and April to August 2025, in transition from rainy to dry seasons.

2.2. Epididymal sperm recovery

The animals were medicated with an intramuscular administration of xylazine hydrochloride (Xilazin® 2%, Syntec, 1mg/kg) and ketamine hydrochloride (Quetamina® 10%, Vetnil, 15mg/kg) as pre-anesthetic medication, and after 15 min general anesthesia was induced

with thiopental (Tiopental sódico® 1g, Richmond, División Veterinaria S.A., 30mg/kg). Once confirmed anesthetic plane, euthanasia was performed by cervical dislocation, as described in the Brazilian Guidelines for Good Practices in Animal Euthanasia (CFMV, 2013). Sequentially, a midline laparotomy was performed to expose and remove the pairs of testis-epididymis complexes. Briefly, the structures were rinsed in saline solution (0.9% NaCl) and transported to the laboratory in beakers containing gauze moistened with saline solution.

Epididymal ducts were isolated, separated into the three different regions (caput, corpus and cauda) and placed in a Petri dish containing 200 μ L of Tris-based medium [3.028g of Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, 1.78g of citric acid monohydrate, and 1.25g of D-fructose dissolved in 100mL ultrapure water; 295mOsm/L, pH 6.8] pre-warmed to 37°C, as established for cavies rodents (*Galea spixii*; Silva *et al.*, 2017). Spermatozoa from each epididymal segment were recovered by the *slicing* technique, as described by Tourmente *et al.* (2022) for hamsters. The immersed tissues were incised, and after 5 minutes sperm suspensions were recovered using micropipettes for evaluation.

2.3. Sperm evaluation

From each epididymal region, volume recovered (μ L) was measured using a single-channel adjustable-volume micropipette (20-200 μ L, LabMate Pro) and transferred to labeled microtubes placed in a water bath at 37°C. The number of sperm collected ($\times 10^6$ sperm) was obtained by multiplying the volume recovered and the respective sperm concentration, measured using a Neubauer chamber (Buranaamnuay *et al.*, 2022; Dantas *et al.*, 2022).

For sperm viability, plasma membrane integrity was assessed using the association of Hoechst 33342 and propidium iodide as fluorescent probes. An aliquot (5 μ L) of each sample was incubated with Hoechst 33342 (2 μ L, 40 μ g/mL in DPBS) for 10 min at 37°C and sequentially was added 3 μ L of propidium iodide (0,5mg/mL in DPBS). After 8 min, preparations were mounted on glass slides and 200 cells were analyzed through epifluorescence microscopy at 400 $\times$ magnification (Balbach *et al.*, 2020). Sperm stained in red (propidium iodide) were classified as having plasma membrane degeneration (non-viable), and those stained only with Hoechst (blue, viable), with intact membranes.

2.4. Sperm kinetics parameters

An aliquot (3µL) of each sample was used for sperm kinetic evaluation using computer-assisted sperm analysis (CASA; IVOS 12.0, Hamilton-Thorne, Beverly, MA, USA). Previously, software was configured according to a predefined setup established for mouse spermatozoa, as reported in the HTM- IVOs Installation and Getting Started Guide Version 14.0 (2011): frame rate (Hz): 60; minimum contrast: 30; minimum cell size (pixels): 4; straightness (%): 50; VAP cutoff (µ/s): 10; VSL cutoff (µ/s): 0; slide warmer temperature: 37; field selection mode: manual. Samples were placed in a pre-warmed microscope chamber (37°C) and submitted to evaluation, where five independent microscopic fields were randomly selected for the scan. The patterns determined were: total motility (MOT, %), progressive motility (MOP, %), average path velocity (VAP, µm/s), straight-line velocity (VSL, µm/s), curvilinear velocity (VCL, µm/s), amplitude of lateral head displacement (ALH, µm), beat cross frequency (BCF, Hz), straightness (STR, %) and linearity (LIN, %).

2.5. Hypoosmotic swelling test (HOST)

To evaluate sperm membrane functionality, aliquots (10µL) containing epididymal sperm were incubated in dry bath for 40min at 37°C with 90µL of different hypoosmotic solutions: Solution I (Distilled water, 0 mOsm/L), Solution II (Fructose, 50 mOsm/L) and Solution III (Fructose, 100 mOsm/L). Then, 10µL of each sample were evaluated under a phase-contrast microscope (×400 magnification). A total of 200 spermatozoa were counted per sample, and those exhibiting coiled tail were classified as swollen sperm and having functional membrane (Dantas *et al.*, 2022). The result was subjected to correction for the number of spermatozoa with morphological defect of coiled tail, based on the evaluation with rose Bengal. For this, an aliquot of each fresh sample (5µL) was also used for a wet preparation with 45µL of rose Bengal solution, and sperm morphology was examined under bright-field light microscopy at 1000× (Silva *et al.*, 2018). A total of 200 spermatozoa were counted, and the percentage of coiled tails was subtracted from the percentage of swollen sperm in HOS test.

2.6. Statistical analysis

All results were expressed as mean ± standard error. Statistical analysis were performed using GraphPad 8.0.2 (Dotmatics, Boston, MA, USA) considering a significance level of $P <$

0.05. Data normality was assessed using Shapiro-Wilk test, and homoscedasticity was evaluated with Bartlett's test. ANOVA followed by Tukey's post-hoc test was used to compare the sperm parameters among the different epididymal segments (caput, corpus and cauda), and to compare the sperm response to different hypoosmotic solutions (0 mOsm/L, 50 mOsm/L, 100 mOsm/L) in each sample; except for the parameters of volume, progressive motility (MOP), curvilinear velocity (VCL) and linearity (LIN), which were analyzed using Kruskal-Wallis test. The correlation between the sperm parameters of each epididymal region and the response to each hypoosmotic solution was analyzed using Pearson's correlation test; and for the parameters of MOP, VCL and LIN, Spearman's correlation test was used.

3. Results

3.1. Sperm evaluation

After sperm recovery, significant differences were observed in the volume and number of sperm recovered among the different epididymal segments (Table 1). The caput and cauda showed higher volumes ($P < 0.05$), whereas the cauda also yielded a greater number of spermatozoa ($28.5 \pm 9.0 \times 10^6$ sperm). Regarding sperm viability, no statistically significant differences were observed among segments.

Table 1. Mean ($\pm$ SE) of sperm parameters from spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*; n=8).

Parameter	Epididymal regions		
	Caput	Corpus	Cauda
Volume (μ L)	175.4 ± 11.9^a	126.3 ± 9.0^b	182.4 ± 20.6^a
Number of sperm ($\times 10^6$ sperm)	6.9 ± 1.0^b	2.8 ± 0.7^b	28.5 ± 9.0^a
Viability (%)	44.4 ± 9.4	44.1 ± 8.6	52.1 ± 11.0

^{a,b} Different uppercase letters indicate statistically significant differences between epididymal regions (caput, corpus and cauda) during ductal transit for each parameter ($P < 0.05$).

Relating to CASA analysis, kinetic parameters of total and progressive motility remained consistent throughout epididymal transit ($P > 0.05$; Table 2). Similarly, trajectory parameters (VAP, VSL, VCL, ALH, BCF, STR and LIN) and the proportion of sperm subpopulations did not differ between regions.

Table 2. Mean ($\pm$ SE) of kinetic parameters of spermatozoa recovered from different epididymal regions of red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*; n=8).

Kinetic parameters	Epididymal regions		
	Caput	Corpus	Cauda
Total motility (%)	65.1 $\pm$ 10.9	65.6 $\pm$ 9.7	85.3 $\pm$ 3.2
Progressive motility (%)	17.6 $\pm$ 3.2	20.6 $\pm$ 7.0	29.0 $\pm$ 4.9
Average path velocity (VAP; μ m/s)	71.9 $\pm$ 10.8	79.6 $\pm$ 13.3	72.4 $\pm$ 5.0
Straight line velocity (VSL; μ m/s)	45.1 $\pm$ 8.3	52.3 $\pm$ 12.2	47.8 $\pm$ 5.9
Curvilinear velocity (VCL; μ m/s)	147.4 $\pm$ 18.9	169.6 $\pm$ 25.0	140.8 $\pm$ 8.8
Amplitude of lateral head displacement (ALH; μ m)	9.5 $\pm$ 0.8	9.5 $\pm$ 1.8	9.2 $\pm$ 0.3
Beat cross frequency (BCF; Hz)	31.1 $\pm$ 4.1	23.6 $\pm$ 5.0	33.6 $\pm$ 2.0
Straightness (STR; %)	56.3 $\pm$ 4.9	57.4 $\pm$ 6.6	57.3 $\pm$ 4.0
Linearity (LIN; %)	29.1 $\pm$ 3.9	28.5 $\pm$ 5.4	31.8 $\pm$ 4.1
Subpopulations			
% of Rapid sperm	35.9 $\pm$ 7.6	32.5 $\pm$ 8.3	44.6 $\pm$ 6.0
% of Medium velocity sperm	28.0 $\pm$ 9.6	26.5 $\pm$ 8.8	35.6 $\pm$ 5.1
% of Slow sperm	12.6 $\pm$ 4.6	6.5 $\pm$ 2.7	2.8 $\pm$ 1.4
% of Static sperm	23.5 $\pm$ 7.9	34.1 $\pm$ 11.3	17.0 $\pm$ 8.7

* No statistical difference was observed in evaluated parameters between the epididymal regions ($P > 0.05$).

3.2. Sperm functional membrane integrity

The percentage of reactivity of red-nosed-mouse epididymal spermatozoa in hypoosmotic swelling test under different osmolarities is shown in Figure 1, where a statistically significant difference was observed in samples incubated at 50 mOsm/L ($P < 0.05$). The highest osmotic response was observed in spermatozoa recovered from the cauda region ($80.3 \pm 2.8\%$), whereas samples from the caput and corpus under the same conditions did not differ statistically ($50.9 \pm 1.7\%$ e $45.4 \pm 4.4\%$, respectively).

3.3. Correlations between functional membrane integrity and other sperm parameters

There were significant correlations between cauda spermatozoa reacted to hypoosmotic solution at 50mOsm/L and the percentage of total motility ($\rho = 0.82$; $P < 0.05$). In addition, other correlations with trajectory parameters were observed in different samples, as shown in Table 3. No significant correlations were found between the incubated samples and sperm viability, VSL, VCL, BCF, or the proportions of rapid, medium and static sperm subpopulations.

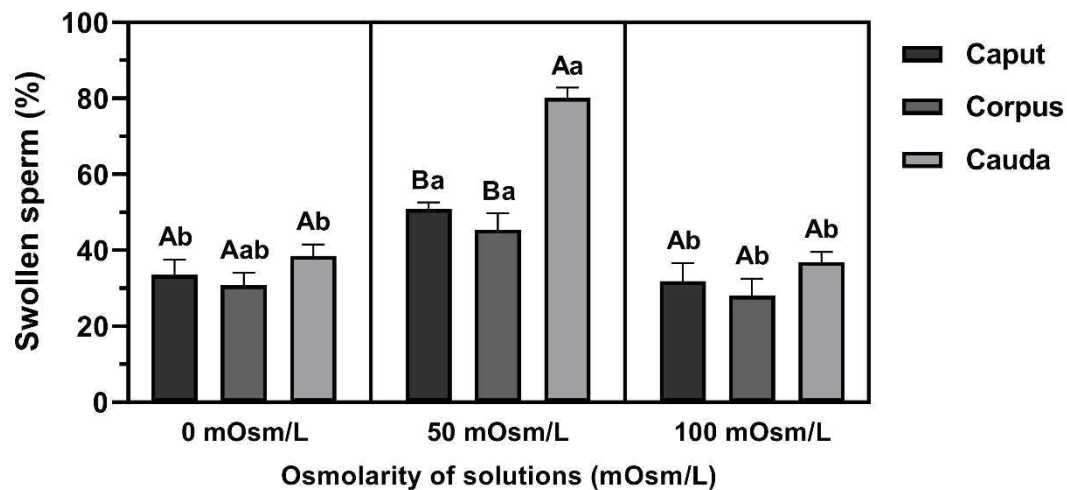


Figure 1. Mean ($\pm$ SE) of swollen spermatozoa (%) reactive to hypoosmotic solutions in each epididymal region. ^{A,B} Different uppercase letters indicate statistically significant differences among epididymal regions (caput, corpus and cauda) incubated under the same osmolarity conditions ($P < 0.05$); and ^{a,b} Different lowercase letters indicate statistically significant differences among the different osmolarities (0, 50 and 100 mOsm/L) for each epididymal region ($P < 0.05$).

Table 3. Correlation (ρ) between the osmotic response to different hypoosmotic solutions and sperm parameters from different epididymal regions of the red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*; $n=8$).

Parameter	Osmolarity of solutions	Epididymal region		
		Caput	Corpus	Cauda
Total motility	50 mOsm/L	n.s.	n.s.	$\rho = 0.82$
Average path velocity (VAP)	100 mOsm/L	n.s.	n.s.	$\rho = 0.87$
Amplitude of lateral head displacement (ALH)	50 mOsm/L	$\rho = 0.79$	n.s.	n.s.
	100 mOsm/L	n.s.	n.s.	$\rho = 0.85$
Straightness (STR)	50 mOsm/L	n.s.	n.s.	$\rho = -0.78$
	100 mOsm/L	n.s.	n.s.	$\rho = 0.79$
Linearity (LIN)	50 mOsm/L	n.s.	n.s.	$\rho = -0.76$
	100 mOsm/L	n.s.	n.s.	$\rho = 0.86$
Slow sperm	50 mOsm/L	n.s.	$\rho = -0.85$	n.s.

*Only sperm parameters that showed significant correlations were expressed in the table ($P < 0.05$).

n.s. = non-significant

Discussion

Through the hypoosmotic swelling test (HOST), we demonstrated that a 50 mOsm/L fructose solution is a reliable and sensitive method for assessing functional competence of the plasma membrane in red-nosed-mouse (*Wiedomys pyrrhorhinos*) spermatozoa. Although HOST has been extensively applied in domestic species as an indicator of functional membrane integrity, no data were previously available for *Wiedomys spp.* sperm. This test allowed for the differentiation of sperm maturation stages, revealing the transition from immature to functionally stable membranes.

Along the epididymal segments, we observed a progressive increase in morphofunctional parameters from caput to cauda, particularly those related to sperm concentration. Similar patterns have been reported for cricetid and dasiproctid rodents, such as the golden hamster (*Mesocricetus auratus*; Kann and Serres, 1980; Weissenberg *et al.* 1994; Sudarshani and Wegiriya, 2022) and red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*; Dantas *et al.*, 2022), in which the distal epididymis functions as a storage site for sperm cells. Conversely, no statistical differences were observed in viability or kinetic parameters, suggesting that the maturational changes in this species may involve more subtle modifications not detectable through conventional assessments alone.

Since supravital staining and fluorescent probes mainly reflect only structural integrity of sperm cells, other assessment methods can complement sperm evaluation and detect more nuanced physiological variations. HOST is based on the premise that only functionally intact cells swell under hypoosmotic conditions, due to the membrane semi-permeability and fluid influx (Drevius e Eriksson, 1996; Lechniak *et al.*, 2002; Hecht e Jeyendran, 2022). However, markedly interspecific variation in osmotic responsiveness has been documented even within phylogenetically close groups of species, requiring methodological adjustments to achieve consistent and meaningful assessment for each taxon. In murine rodents, distilled water (0 mOsm/L) is widely used to evaluate sperm membrane function (Sliwa, 1993), while in chinchillids and caviids, is commonly employed an osmolarity of 100 mOsm/L (Ponce *et al.*, 1998; Silva *et al.*, 2017). In contrast, in the present study, both 0 and 100 mOsm/L solutions maintained reactive sperm counts fewer than 40% for *Wiedomys* sperm, reinforcing the variation in osmotic tolerance during sperm evaluation for different species.

The intermediate solution (50 mOsm/L, fructose) proved to be the most suitable osmotic stimulus for evaluating red-nosed-mouse epididymal spermatozoa independently from the epididymal region, in comparison to the extreme ones (0 and 100 mOsm/L), indicating that the

osmotic pressure generates sufficient swelling response, but without causing membrane rupture and lysis (Jeyendran *et al.*, 1984; Santos *et al.*, 2013). A comparable pattern has been described for *Dasyprocta leporine* (Dasiproctid) sperm, in which the incubation of mature spermatozoa in 50 mOsm/L resulted in more than 80% reactive sperm (Dantas *et al.*, 2022). Such interspecific variation in the response of sperm to different osmolarities reflects from species-specific membrane composition and permeability characteristics (Zubair *et al.*, 2015).

Spermatozoa recovered from the epididymal cauda and incubated in the 50 mOsm/L solution exhibited a significantly higher proportion of functional membranes ($80.3 \pm 2.8\%$) compared to those from the caput and corpus submitted to the same conditions ($50.9 \pm 1.7\%$ e $45.4 \pm 4.4\%$, respectively). This marked increase in reactivity along the duct provides evidence of the physiological maturation and increased osmotic resistance acquired during transit. As sperm travel through the epididymis, their membranes undergo remodeling and biochemical maturation, driven by concentration gradients of specific enzymes and molecules that are carefully coordinated at different zones of the epididymis (Jones *et al.*, 1998; James *et al.*, 2020). These modifications in the cell surface indirectly affect intracellular metabolism, enhancing motility, membrane stability and fertilizing ability, since the membrane is the structure that meets the zona pellucida of the oocyte, and therefore its structure and functionality is essential for the success of the fertilization process (Jones, 1989; Jones, 1998; James *et al.*, 2020). Thus, our finding confirms that *W. pyrrhorhinos* follows the mammalian pattern of epididymal maturation, where the storage of gametes in epididymal cauda typically occurs to cells with increased structural and functional competence.

Beyond eliciting the highest percentage of reacted cells in cauda, incubation in 50 mOsm/L showed a strong positive correlation with total motility ($\rho = 0.82$), which also has been reported in humans, goats, bulls, stallions and dogs (Jeyendran *et al.*, 1984; Nur *et al.*, 2005; Siqueira *et al.*, 2007; Melo and Henry, 1999; Kumi-Diaka, 1993). Although the axonemal apparatus is present even in testicular and immature spermatozoa, the development of functional motility depends partly on the reorganization of membrane composition and permeability during epididymal transit, which ensures efficient regulation of ion and fluid exchange (Jeyendran *et al.*, 1984; Jones, 1989; Dantas *et al.*, 2022). In this context, the correlation observed reinforces that the response at 50 mOsm/L is the most physiologically meaningful, and highlights that the membrane functionality in red-nosed-mouse is tightly integrated with the maturation of kinetic characteristics.

1. Conclusion

From the discussed results, we suggest that the HOST using a 50 mOsm/L fructose solution represents a reliable and sensitive method for assessing membrane functionality in the red-nosed-mouse sperm, in comparison to 0 and 100 mOsm/L solutions. This protocol enabled the characterization of physiological sperm maturation in species, demonstrating a significant increase in membrane functional competence as spermatozoa transit throughout epididymis. Given the absence of previous reports, our findings contribute with fundamental basis for understanding reproductive physiology in species, and provide methodological insight for the incorporation of this approach into future reproductive assessments.

Acknowledgements

Authors would like to thank Center of Wild Animals Multiplication (CEMAS/UFERSA) for providing the red-nosed-mouse specimens used in the experiment.

Ethics statement

This research was conducted ensuring health and welfare of the animals, with approval from the Ethics Committee for the Use of Animals in Experimentation at UFERSA (CEUA UFERSA: 37/2025) and authorized by the Chico Mendes Institute for Biodiversity Conservation (ICMBio SISBIO No. 84083-1).

Financial support

This study was financed, in part, by the Brazilian Federal Agency for Support and Evaluation of Graduate Education (CAPES, Financial Code 001). MF Oliveira and AR Silva are researchers at the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq).

Author contribution

YGM and ARS contributed to the conceptualization of the study. YGM, AGP, RPS, TMM, YCSC and LLD executed the experiment and analysis. MFO and ARS were involved in the investigation and resource management. YGM and RPS contributed to data analysis. YGM

was responsible for writing the original draft of the manuscript. ARS reviewed and edited the manuscript and managed the project administration. All authors have read and approved the final manuscript.

Declaration of conflict of interests

Authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability statement

Data that support the findings of this study are available from the authors upon request.

References

- BALBACH, M.; GERVASI, M.G.; HIDALGO, D.M.; VISCONTI, P.; LEVIN, L.R.; BUCK, J. Metabolic changes in mouse sperm during capacitation. *Biology of Reproduction*, v.103, n.4, p.791-801, 2020.
- BRITO, P.A.P.; MATOS, Y.G.; LUZ, N.R.N.; BEZERRA, G.S.C.; SILVA, A.M.; SILVA, A.R. Morphological, morphometric and ultrastructural characterization of epididymal spermatozoa from red-nosed rats (*Wiedomys pyrrhorhinos*). In: Abstracts from 14th Biennial Conference 4A. Animal Reproduction Science, v.272, Supplement, 107750, 2025.
- BURANAAMNUAY, K. The effect of cryopreservation media on the quality of β -thalassemia mouse spermatozoa. *Open Veterinary Journal*, v.12, n.5, p.602, 2022.
- CFMV. Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais: Conceitos e Procedimentos Recomendados. Brasília: CFMV, 2013. 66p.
- CUNHA-FILHO, C.A. Implicações taxonômicas e biogeográficas da variação morfológica em *Wiedomys* (Rodentia, Sigmodontinae). 2019. 113f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Conservação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.
- DANTAS, M.R.T.; LUZ, N.R.N.; BEZERRA, L.G.P.; MOREIRA, S.S.J.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Evaluation of sperm membrane functionality during epididymal transit in red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina*). *Reproduction in Domestic Animals*, v.57, n.8, 2022.
- DANTAS, M.R.T.; SILVA, A.M.; BEZERRA, L.G.P.; PEREIRA, A.G.; LUZ, N.R.N.; SOUZA-JUNIOR, J.B.F.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Morphological, morphometric, ultrastructural, and functional evaluation of red-rumped agouti (*Dasyprocta leporine*) sperm during epididymal transit. *Animal Reproduction Science*, v.243, p.107029. 2022.
- DREVIUS, L.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. *Experimental Cell Research*, v.42, p.136-56, 1966.
- FARIA, M.B.; KAIZER, M.C. Pequenos mamíferos não-voadores (Didelphimorphia e Rodentia): estudo de impacto ambiental em uma região de ecótono entre a Mata Atlântica e a Caatinga. *Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia*, v.89, p.74-82, 2020.
- FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; ROVAY, H.; BORGES, A.M.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D.B.M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 25, p.436-457, 2001.
- HECHT BR, JEYENDRAN RS. The hypo-osmotic swelling test: Is It a sperm vitality or a viability assay?. *F&S Science*, 2022, v3, n.1, p.18-20, 2022.
- JAMES, E.R.; CARRELL, D.T.; ASTON, K.I.; JENKINS, T.G.; YESTE, M.; SALAS-HUETOS, A. The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International Journal of Molecular Sciences*, v.21, n.15, p.5377, 2020.

- JEYENDRAN, R.; VAN DER VEN, H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, M.; ZANEVELD, L. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relation to other semen characteristics. *Journal of reproduction and fertility*, v.70, p.219-228, 1984.
- JONES, R. Membrane remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Oxford Reviews of Reproductive Biology*, v.11, p.285-337, 1989.
- JONES, R. Plasma membrane structure and remodelling during sperm maturation in the epididymis. *Journal of Reproduction and Fertility*, v.53, p.73-84, 1998.
- KANN, M-L.; SERRES, C. Development and initiation of sperm motility in the hamster epididymis. *Reproduction Nutrition Development*, v.20, n.6, p.1739-1749. 1980.
- KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic test. *Theriogenology*, v.39, p.1279- 1289, 1993
- LEBOUEF, B.; LE VERN, Y.; FURSTOSS, V.; KERBOEUF, D.; GUILLOUET, P.; MAGISTRINI, M. Response of goat sperm to hypoosmotic steps modeled probit analysis. *Animal Reproduction Science*, v.36, p.265-274, 2006.
- LECHNIAK, D.; KEDZIERSKI, A.; STANISLAWSKI, D. The use of HOS test to evaluate membrane functionality of boar sperm capacitated in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*, v.37, p.379-380, 2002.
- MANGAN, S.A.; ADLER, G.H. Consumption of arbuscular mycorrhizal fungi by terrestrial and arboreal small mammals in a Panamanian cloud forest. *Journal of Mammalogy*, v.81, p.563-570, 2000.
- MATSON, P.; KAPPELLE, W.; MALECKI, I. The use of a hypo-osmotic swelling (HOS) test on sperm of the pig (*Sus scrofa domestica*), emu (*Dromaius novaehollandiae*), Asian elephant (*Elephas maximus*), hamadryas baboon (*Papio hamadryas hamadryas*), and central rock rat (*Zyomys pedunculatus*). *Reproductive Biology*, v.9, p.181-187, 2009.
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veerínária e Zootecnia*, v.51, p.273-276, 1999.
- MELO, M.I.V.; SNOECK, P.P.N.; BISPO, C.; HENRY, M. Effect of solution and incubation time on hypoosmotic test results for frozen equine semen. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.27, p.379-380, 2003.
- NUR, Z.; DOGAN, I.; GUNAY, U.; SOYLO, M. K. Relationships between sperm membrane integrity and other semen quality characteristics of the semen of saanen goat bucks. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, v.49, p.183-187, 2005.
- OLIVEIRA, I.R.S.; ALVES, H.M.; CASTELO, T.S.; BEZERRA, F.S.B.; BEZERRA, A.C.D.S.; SILVA, A.R. Correlations between hypoosmotic swelling test and the classical evaluation of goat semen. *Ciência Animal Brasileira*, v.14, p.216-221, 2013.

- PONCE, A.A.; AIRES, V.A.; CARRASCOSA, R.; FIOL DE CUNEO, M.; RUIZ, R.D.; LACUARA, J.L. Functional activity of epididymal *Chinchilla laniger* spermatozoa cryopreserved in different extenders. *Research in Veterinary Science*, v.64, p.239-243, 1998.
- SANTOS, E.A.A.; SOUSA, P.C.; PEIXOTO, G.C.X.; SIMÃO, B.R.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (*Pecari tajacu*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.65, p.1257-1260, 2013.
- SILVA, A.M.; PRAXEDES, E.C.G.; CAMPOS, L.B.; BEZERRA, L.G.P.; MOREIRA, S.S.J.; MAIA, K.M.; SOUZA, A.L.P.; SILVA, A.R. Epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies sperm successfully cryopreserved in Tris extender with 6% glycerol and 20% egg yolk. *Animal Reproduction Science*, v.191, p.64-69, 2018.
- SILVA, A.M.; SOUSA, P.C.; CAMPOS, L.B.; BEZERRA, J.A.B.; ARAÚJO LAGO, A.E.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Comparison of different extenders on the recovery and longevity of epididymal sperm from Spix's yellow-toothed cavies (*Galea spixii* Wagler, 1831). *Zygote*, v.25, n.2, 2017.
- SILVA, M.A.; PEIXOTO, G.C.X.; SANTOS, E.A.A.; CASTELO, T.S.; OLIVEIRA, M.F.; SILVA, A.R. Recovery and cryopreservation of epididymal sperm from agouti (*Dasyprocta aguti*) using powdered coconut water (ACP-109c) and Tris extenders. *Theriogenology*, v.76, p.108-1089, 2011.
- SIQUEIRA, J.B.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; HENRY, M.; TORRES, C.A.A.; SILVA, M.V.G.B.; SILVEIRA, T.S. Relação da taxa de gestação com sêmen bovino congelado e testes de avaliação espermática in vitro. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.36, p.387-395, 2007.
- SLIWA, L. Usability of the hypoosmotic swelling "Water-test"- a simple method to assess sperm membrane integrity in mouse spermatozoa. *Folia Biologica*, v.41, p.29-31, 1993.
- SOBRAL, G.; OLIVEIRA, J.A. Annual age structure and reproduction in the Caatinga red-nosed mouse *Wiedomys pyrrhorhinos*. *Therya*, v.5, n.2, p.509-534, 2014.
- SOLER, C.; YEUNG, C.H.; COOPER, T.G. Development of sperm motility patterns in the murine epididymis. *International Journal of Andrology*, v.17, p.271-278, 1994.
- SUDARSHANI, K.A.M.; WEGIRIYA, H.C.E. An investigation on cauda storage of sperm in hamster epididymis. *Animal Biology*, v.72, p.367-383, 2022.
- TOURMENTE, M.; SANCHEZ-RODRIGUEZ, A.; ROLDAN, E.R.S. Effect of Motility Factors D-Penicillamine, Hypotaurine and Epinephrine on the Performance of Spermatozoa from Five Hamster Species. *Biology*, v.11, n.4, p.526, 2022.
- WEISSENBERG, R.; YOSSEFI, S.; OSCHRY, Y.; MADGAR, I.; LEWIN, L.M. Investigation of epididymal sperm maturation in the golden hamster. *International Journal of Andrology*, v.17, p.256-261, 1994.
- ZUBAIR, M.; AHMAD, M.; JAMIL, H. Review on the screening of semen by hypo-osmotic swelling test. *Andrologia*, v.47, p.744-50, 2015.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Este trabalho descreve, pela primeira vez, as características morfofisiológicas dos espermatozoides do rato-do-nariz-vermelho ao longo do processo de maturação espermática no epidídimo. Foi observado um padrão de aumento progressivo nos parâmetros espermáticos estruturais e da competência funcional enquanto o espermatozoide é transportado pelo ducto epididimário, até atingir o sítio de armazenamento na cauda. Através de análises morfológicas clássicas e avançadas, como a Microscopia Eletrônica de Varredura, foi possível caracterizar detalhadamente a morfologia da célula espermática, oferecendo uma visualização ultraestrutural inédita para a espécie e discutindo as relações de semelhanças e diferenças com roedores filogeneticamente próximos.

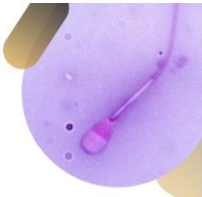
Adicionalmente, foi validado uma solução hiposmótica ideal para aplicação do teste hiposmótico na espécie, ampliando as técnicas para avaliação espermática em *W. pyrrhorhinos*. A partir de uma solução de frutose a 50mOsm/L, foi identificado um ganho significativo na funcionalidade da membrana plasmática como parte do processo de maturação da célula, além de demonstrar correlação com outros parâmetros funcionais, como a evolução das características cinéticas dos espermatozoides.

Estes achados preenchem lacunas sobre a fisiologia reprodutiva desse roedor típico da Caatinga, representando um avanço significativo nas bases de conhecimento da mastofauna de um bioma frequentemente negligenciado e que carece de enfoque científico para fundamentar estratégias de conservação eficazes. Diante desse cenário, este estudo também abre perspectivas para investigações futuras por consolidar protocolos de avaliação espermática específicos para o rato-do-nariz-vermelho. A partir dos resultados obtidos, torna-se possível o desenvolvimento de metodologias para criopreservação de espermatozoides e formação de bancos de germoplasma da Caatinga contendo material genético deste roedor cricetídeo, sendo fundamental para a manutenção da biodiversidade frente às pressões ambientais.

ANEXO A – Resumo apresentado na 14ª Conferência Bienal 4A (Association for Applied Animal Andrology)



Association for Applied Animal Andrology
14th 4A Biennial Conference
 3-5 JULY 2024 - FORTALEZA, BRAZIL



We hereby certify that the abstract titled **Morphological, morphometric and ultrastructural characterization of epididymal spermatozoa from red-nosed rats (*Wiedomys pyrrhorhinos*)** was presented as poster by **Pedro Augusto Pinheiro Brito, Yuri Gonçalves Matos, Náyra Rachel Nascimento Luz, Gabriel Santos Costa Bezerra, Andréia Maria da Silva and Alexandre Rodrigues Silva**, at the 14th Biennial 4A Conference.

Fortaleza, Brazil, July 3-5, 2024.


 PROF. JOHN P. KASTELIC
 COORDINATOR OF 14TH 4A MEETING
 PRESIDENT OF THE 4A EXECUTIVE TEAM (2022-2024)

SUPPORT AND SPONSORSHIP



ANEXO B – Resumo apresentado na VIII Reunião Anual da ABRAA (Associação Brasileira de Andrologia Animal)



13a15 de junho 2024

Campo Grande-MS

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado

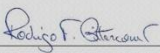
Integridade funcional da membrana plasmática de espermatozoides epididimários de rato-do-nariz-vermelho (*Wiedomys pyrrhorhinos*) em diferentes soluções hiposmóticas e correlações com outros parâmetros funcionais- resultados preliminares,

de autoria de Alexandre Rodrigues Silva, Yuri Gonçalves Matos, Ana Glória Pereira e Romário Parente dos Santos,

foi apresentado por **Alexandre Rodrigues Silva**

na VIII Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal,

realizada nos dias 13 a 15 de junho de 2024.


 Prof. Dr. Rodrigo Freitas Bittencourt


 Prof. Dr. André Furugen Cesar de Andrade

ANEXO C – Comprovante de submissão no periódico *Reproduction, Fertility and Development* (FI: 1.8 / QUALIS A2)

Submission Confirmation

Thank you for your submission

Submitted to	Reproduction, Fertility and Development
Manuscript ID	RD26012
Title	Regional morphofunctional features of sperm maturation in the epididymis of the rednosed-mouse (<i>Wiedomys pyrrhorhinos</i>)
Authors	Matos, Yuri Santos, Romário Silva, Andreia Bezerra, Luana Brito, Pedro Bezerra, Gabriel Oliveira, Radan Silva, Alexandre Oliveira, Moacir
Date Submitted	14-Jan-2026
