

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

TESTE HIPOSMÓTICO

Autor: Fernando Paiva Chapon

PORTO ALEGRE

2011/2

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

COMISSÃO DE ESTÁGIOS

TESTE HIPOSMÓTICO

Autor: Fernando Paiva Chapon

Monografia apresentada à Faculdade de Veterinária como requisito parcial para obtenção da graduação em Medicina Veterinária.

Orientadora: Ender Rosana Oberst

PORTO ALEGRE

2011/2

RESUMO

O teste hiposmótico foi inicialmente desenvolvido, por Jeyendran *et al.*, 1984, para ser utilizado em sêmen humano. Com o decorrer do tempo outros estudiosos passaram a realizar trabalhos com diferentes espécies de animais, tais como: equina, canina, ovina e caprina. O teste baseia-se na reação da membrana plasmática do espermatozóide, que em meio hiposmótico, possibilita a passagem de água até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluídos extra e intracelulares. A entrada de líquido para o interior celular ocasiona um aumento do volume celular (edema) e posterior dobramento da cauda do espermatozóide. O presente trabalho, testou a reatividade das células espermáticas de ovinos em solução de citrato-frutose com diferentes osmolaridades (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 e 290 mOsm/L). Todas as amostras foram avaliadas após colocadas em banho-maria a 37° C durante 60 minutos. O teste não apresentou diferença estatística significativa entre as diferentes osmolaridades não podendo assim, determinar qual delas é a ideal para a utilização nos teste de avaliação do sêmem em ovinos.

ABSTRACT

The hypoosmotic test was initially developed by Jeyendran to be used in human semen. Over time, other studies were initiated in different species such as equine, canine, sheep and goats. The test is based on the reaction of the sperm plasma membrane, which in hypoosmotic medium, allows the passage of water until the restoration of osmotic equilibrium between the extra and intracellular fluids. The entry of fluid into the cell interior causes an increase of the cell volume (edema) and subsequent folding of the sperm tail. This study tested the reactivity of the sperm cells of sheep-fructose citrate solution with different osmolarities (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 and 290 mOsm / L). All samples were evaluated after water bath at 37 ° C for 60 minutes. Test showed no statistically significant differences between the different osmolarities and therefore can't determine which one is ideal for use in the sheep semen assessment.

Sumário

1	INTRODUÇÃO	6
2	MEMBRANA PLASMÁTICA	7
2.1	Bicamada de lipídeos e proteínas	7
2.2	Membrana plasmática do espermatozóide	8
2.3	Conservação de sêmen e integridade da membrana espermática	9
2.4	Avaliação da integridade da membrana espermática através de coloração	10
3	O TESTE HIPOSMÓTICO	12
3.1	Mecanismo do teste	12
3.2	Soluções, tempos e temperaturas utilizados	13
3.3	Análise e contagem	16
4	EXPERIMENTO REALIZADO	18
4.1	Introdução	18
4.2	Objetivos	18
4.3	Material e Métodos	18
4.4	Resultado e Discussão	19
5	CONCLUSÕES	20
	REFERÊNCIAS	21

1 INTRODUÇÃO

A análise da integridade e funcionalidade estrutural da membrana espermática é considerada crucial para a avaliação da viabilidade e da capacidade de fertilização do espermatozóide. Usualmente utiliza-se coloração com azul de trypan ou com eosina para a avaliação da integridade da membrana, porém estas colorações avaliam apenas a integridade estrutural e não a funcional da membrana espermática.

A avaliação da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide, através do teste hiposmótico, é considerada como um indicador de fertilidade por ser um requisito básico para a fertilização. (MELO, 1999). O teste se baseia no comportamento da célula espermática frente a um meio hiposmótico. Na tentativa de equilibrar o meio extra e intracelular, ocorrendo um influxo de água através da membrana, gerando assim um aumento do volume celular (edema). Com o edema, a cauda se “enrola” e esta alteração é facilmente visualizada em microscopia óptica.

O presente estudo teve como objetivo testar diferentes soluções de citrato-frutose de várias osmolaridades: 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 e 290 mOsm/L., em pool de amostras de sêmen puro, coletadas por vagina artificial de dois reprodutores ovinos, para indicar a solução de maior grau de reação e acrescentar mais segurança aos protocolos de avaliação de sêmen ovino. É importante ressaltar que este teste ainda não possui um protocolo padrão estabelecido para a espécie ovina.

2 MEMBRANA PLASMÁTICA

Todas as células (procariontes ou eucariontes) são circundadas por uma membrana plasmática (MP), separando seu conteúdo do meio que a envolve. Por servir de barreira seletiva, a MP determina a composição do citoplasma celular (COOPER, 1996), e tem papel fundamental na maioria dos fenômenos celulares (SINGER e NICOLSON, 1972).

A permeabilidade altamente seletiva das membranas biológicas serve como regulador da composição molecular e iônica do meio intracelular utilizando-se de sistemas especializados, na forma de bombas e passagens moleculares (ZÚCCARI, 1998).

As células espermáticas dos mamíferos são um exemplo de especialização, possuindo uma membrana plasmática compartimentalizada, que podem ser subdivididas em cinco regiões, conhecidas como acrossoma, segmento equatorial, lâmina pós-acrossomal, peça intermediária e peça principal/terminal (Eddy e O'Brien, 1994, Christovan *et al.*, 2004).

2.1 Bicamada de lipídeos e proteínas

O espermatozóide possui uma membrana plasmática formada por uma bicamada lipídica e protéica. Os lipídios da membrana são moléculas anfipáticas, ou seja, possuem uma extremidade hidrofílica (ou polar) e uma extremidade hidrofóbica (ou apolar). A maior parte da composição deste são fosfolipídios, apresentando uma cabeça polar e duas caudas de hidrocarbonetos hidrofóbicas.

A organização estrutural das membranas biológicas segue o modelo básico da bicamada de lipídios com proteínas associadas (GENNIS, 1989; COOPER, 1996). Os lipídios de destaque nesta estrutura celular são fosfolipídios (colina, serina, glicerol e inositol), glicolipídios e colesterol. Os fosfolipídios são constituintes de 50% da massa das membranas plasmáticas, sendo responsáveis por cerca de 60 a 70% dos lipídios totais de um ejaculado (WATSON, 1981). Os glicolipídios são encontrados exclusivamente no folheto externo da membrana plasmática, constituindo cerca de 2%

dos lipídios totais da membrana (COOPER, 1996). O colesterol está presente em grande quantidade na membrana, equivalendo-se às mesmas quantidades molares que os fosfolipídios (COOPER, 1996). A quantidade de colesterol encontrada na membrana espermática varia entre seus domínios, entre as espécies animais e entre indivíduos da mesma espécie (GENNIS, 1989; AMANN e GRAHAM, 1993; HOLT, 1995; CROSS, 1998). O colesterol tem extraordinário papel na regulação da constância e da permeabilidade da MP (YAGLE, 1985), sendo que o influxo de colesterol da MP dos espermatozoides é o primeiro passo para o início do processo de capacitação (SEKI *et al.*, 1992).

Sabendo que os fosfolipídios são componentes estruturais fundamentais das membranas, as proteínas desempenham a função de intermediar e realizar suas funções específicas (COOPER, 1996). As proteínas membranares são classificadas, com base na força de interação com os fosfolipídios, em intrínsecas e extrínsecas. As proteínas extrínsecas ou periféricas fixam-se às superfícies interna ou externa por forças eletrostáticas e podem ser removidas por procedimentos químicos fracos (ex.: alterações na composição iônica do meio).

A ligação exercida pelos carboidratos é realizada na superfície externa das proteínas membranares e dos lipídios, formando as glicoproteínas e os glicolípido, respectivamente. A camada resultante de carboidratos na superfície membrana externa constitui o glicocálice, que desempenha importantes funções. Alguns glicolípido e glicoproteínas contêm ácido siálico que confere uma carga negativa à célula, permitindo-lhe afugentar substâncias carregadas negativamente; participa na adesão entre células e em reações imunes e algumas funcionam como receptores para ligação de hormonais como é o caso da insulina.

2.2 Membrana plasmática do espermatozoide

As membranas espermáticas seguem o modelo clássico de membrana plasmática (WATSON, 1981; WATSON, 1995). Entretanto, a membrana plasmática dos espermatozoides de mamíferos apresenta-se organizada em domínios regionais bem delineados que diferem em composição e função (WOLFE *et al.*, 1998).

A membrana plasmática envolvida na cabeça do espermatozóide possui dois domínios maiores: região acrossomal e região pós-acrossomal. Na primeira região mencionada aqui a membrana pode ser novamente dividida em segmento marginal (apical), segmento principal (acrossomal) e segmento equatorial, sendo que os segmentos marginais e principais, juntos, são denominados de capa acrossomal. No flagelo, observa-se o domínio da peça intermediária, que cobre a bainha mitocondrial, e o domínio da cauda posterior, que cobre a peça principal e terminal da cauda (EDDY e O'BRIEN, 1994).

O anel posterior separa a membrana plasmática da cabeça do espermatozóide da membrana plasmática da peça intermediária, e a membrana da peça intermediária é separada da membrana do flagelo pelo anel anular. Estes diferentes domínios contêm variadas concentrações e distribuições de partículas intramembranas (FLESCHE e GADELLA, 2000).

A capacidade fertilizante das células é altamente influenciada pela membrana plasmática, modificando-se ao longo do processo de espermatogênese, trânsito e armazenagem no epidídimo, ejaculação, depósito no trato genital feminino e, finalmente, capacitação e penetração do oócito (HOLT, 1995; WATSON, 1995; LENZI *et al.*, 1996). Contudo, é importante que esta estrutura mantenha-se íntegra e funcionalmente para que a célula tenha viabilidade e capacidade fertilizante (PARKS e GRAHAN, 1992; KUMI-DIAKA, 1993). Para avaliar tal integridade alguns testes laboratoriais podem ser realizados, dentre eles a avaliação a partir da utilização de sondas fluorescente e o teste hiposmótico.

2.3 Conservação de sêmen e integridade da membrana espermática

As técnicas de preservação de sêmen podem promover graves alterações na membrana plasmática do espermatozóide.

O resfriamento é uma técnica, que promove a alteração dos lipídios, o que pode afetar a estabilidade da membrana ou induzir a um rearranjo das moléculas da fase hexagonal II, desenvolvendo assim pontos de fragilidade que promoverão uma permeabilidade excessiva ou mesmo, a ruptura da membrana.

A produção ineficiente de ATP é outra alteração que pode ser provocada pelo resfriamento, ocasionando diversas modificações na fisiologia espermática, principalmente a abertura dos canais de cálcio promovendo posteriormente a hidrólise dos fosfolipídios danificando e aumentando a permeabilidade da MP do espermatozóide (AMANN e PICKETT, 1987). A fase hexagonal II pode ser transitória ou persistir irreversivelmente mesmo após o aquecimento (PARKS e GRAHAM, 1992).

As alterações provocadas pelo frio desestabilizam a estrutura fluida da membrana plasmática, causando perda de sua integridade e da função celular (JOHNSON *et al.*, 2000; HAMMERSTED *et al.*, 1990). Ocorrem alterações na peça intermediária, inativação das mitocôndrias, a cauda se dobra e a movimentação espermática cessa.

Na congelação de sêmen, a contínua queda de temperatura, produz alterações físicas na membrana, que passa do estado líquido ao de gel, onde as cadeias de ácidos graxos que se encontravam aleatoriamente distribuídas ordenam-se paralelamente, produzindo uma estrutura rígida, tornando estas áreas fracas e susceptíveis a rupturas, fusões e permeáveis a íons. (HAMMERSTED *et al.*, 1990).

O espermatozóide, ao contrário de outras células, não possui a capacidade de restaurar a membrana plasmática quando lesionada, devido à fluidez da membrana ser baixa e o espermatozóide ter uma quantidade mínima de citoplasma, ficando assim comprometida a capacidade de síntese regenerativa (CARDULLO e WOLF, 1990).

2.4 Avaliação da integridade da membrana espermática através de coloração

Durante anos, a integridade da membrana plasmática celular tem sido avaliada por meio da utilização decorante. Colorações tais como a eosina/nigrosina ou o trypan-blue, também chamadas de colorações “vitais”, comumente são utilizadas para verificar a integridade física da membrana plasmática do espermatozóide (BRITO *et al.*, 2003).

A coloração com sondas fluorescentes como diacetato de carboxifluoresceína (CFDA), o iodeto de propídio (IP) e o Hoechst 33258 são alguns dos métodos utilizados

para detectar a integridade de membrana celular (GARNER *et al.*, 1986 e HARRISON e VICKERS, 1990; SMITH e MURRAY, 1997).

O simples fato de se avaliar a integridade física da membrana plasmática do espermatozóide não é suficiente para prever a possível capacidade de fertilizar da célula espermática (JAGER *et al.*, 1991), pois a funcionalidade bioquímica da MP é um dos fatores que possibilita ao espermatozóide reconhecer o oócito e desencadear assim, todo o processo de penetração/fertilização.

As análises realizadas pelo exame andrológico do sêmen (concentração, motilidade e morfologia) são insuficientes para o diagnóstico de fertilidade, a não ser que os parâmetros analisados estejam muito diferentes da normalidade considerada para cada espécie. O número absoluto de espermatozoides não é capaz de prever um diagnóstico de fertilidade e sim a sua capacidade funcional Alves (2006).

3 O TESTE HIPOSMÓTICO

A primeira utilização do teste hiposmótico (HOST) foi realizada em espermatozóides humanos (JEYENDRAN et al., 1984), com o intuito de analisar a função bioquímica da membrana plasmática espermática intacta.

A membrana plasmática está envolvida com trocas metabólicas com o meio extracelular e, por isso a grande importância do estudo da funcionalidade da mesma, somado aos parâmetros tradicionais de avaliação da qualidade do sêmen, com a finalidade de aumentar os índices de fertilidade (LAGARES et al., 1998).

3.1 Mecanismo do teste

O teste é realizado com o intuito de observar a reação do espermatozóide, contendo uma membrana celular íntegra, quando colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água através da membrana, até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre fluidos extra e intracelular (JEYENDRAN et al., 1984, SANTOS et al., 2001).

Com a passagem da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), ocasionando assim o dobramento da cauda (JEYENDRAN *et al.*, 1984). O teste tem sido utilizado como forma de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas espécies: humanos (JEYENDRAN *et al.*, 1984), eqüinos (ALVES *et al.*, 2004; MELO, 1999), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), ovinos (OBERST *et al.*, 2003) e caprinos (FONSECA *et al.*, 2001; SANTOS *et al.*, 2001; SALGUEIRO *et al.*, 2003).

É interessante observar que em peixes, tanto nas espécies de água doce quanto nas marinhas, a exposição do espermatozóide à água destilada determina a ativação da motilidade espermática, mas também leva a diferentes tipos de alteração no flagelo espermático. Após a ativação, ocorre um choque hiposmótico e o posterior enrolamento da cauda, determinando o curto período de motilidade espermática que é verificado na maioria das espécies de peixes (AMARAL *et al.*, 2003 COSSON *et al.*, 1995, 2008; ALAVI *et al.*, 2009; SOARES *et al.* 2010.)

3.2 Soluções, tempos e temperaturas utilizados

Na literatura consultada, verifica-se uma grande variação entre as soluções, tempos de incubação e temperaturas utilizados para a realização do teste, nas várias espécies animais em que este tem sido empregado.

Jeyendran *et al.* (1984) obtiveram melhores índices de reações espermáticas ao teste com as soluções de 150 mOsmol ou menos. O teste foi realizado em sêmen humano, onde foi testado soluções com osmolaridades que variavam de 50 a 300 mOsmol. Ainda foram testados diferentes solutos (citrato de sódio, sucrose, melitose, frutose e cloreto de sódio) e a associação entre eles. Foi verificado que a taxa de reação espermática flutuava de acordo com a solução usada, dentro da mesma faixa de osmolaridade. A combinação entre citrato de sódio (50%) e frutose (50%) a 150 mOsmol/L, incubada por 30 minutos a 37°C apresentou os melhores resultados.

Melo e Henry (1999) observaram que as soluções com osmolaridade acima de 250m Osmol/ Kg H₂O, tem a tendência de promover menores percentuais de reação hiposmótica nos espermatozóides, pois chegam muito próximos da osmolaridade do plasma seminal. Nie e Wenzel (2001) e Fonseca *et al.* (2005), verificaram o mesmo no sêmen eqüino e caprino, respectivamente.

Vidament *et al.* (1998) e Melo e Henry (1999), encontraram grande correlação entre espermatozóides reagidos ao HOST com a motilidade espermática, em sêmen de garanhões. Nesta espécie, após estudo com a intenção de padronização do teste, Melo (1999), observou que, independentemente do soluto utilizado, as taxas de maior reação foram conseguidas utilizando-se as soluções entre 50 mOsmol/L e 150mOsmol/L incubadas por 30 minutos a 37°C.

Em eqüinos Melo (1999), após estudo com a intenção de padronizar o HOST nesta espécie, observou que, independentemente do soluto utilizado, as taxas de maior reação ao teste foram conseguidas utilizando-se as soluções entre 50 mOsmol/L e 150mOsmol/L incubadas por 30 minutos a 37°C.

Em estudo realizado em caprinos, as soluções hiposmóticas de 125 e 150 mOsmol/L apresentaram a maior percentagem de reação espermática (dobramento de cauda) pela solução utilizada de citrato de sódio (50%) e frutose (50%) em água destilada, e foram testadas osmolaridades que variavam de 50 a 300 mOsmol. Fonseca *et al.*, (2001)

A mesma combinação de solutos (citrato de sódio 50% e frutose 50%), a 60 mOsmol e um tempo de incubação de 60 minutos, a 37° C apresentou bons resultados (SANTOS *et al.*, 2001). Esse tempo é diferente ao preconizado por Caiza de la Cueva *et al.* (1997), que citam 20 a 30 minutos como tempo ideal para que ocorram as reações.

A melhor taxa de reação, por parte dos espermatozóides de coelhos, foi a solução de 60 mOsmol/L, em tempo de incubação de 60 minutos, a 37° C. Amorim *et al.*, (2008). Em caninos, também foi referido que a solução que apresentou a maior taxa de reação dos espermatozóides foi a de 60 mOsmol/L (KUMI - DIAKA, 1993).

Em estudo realizado por Martins *et al.* (2011), na raça zebuína, foram avaliadas diferentes osmolaridades e tempos de incubação utilizados no teste hiposmótico e suas relações com a congelabilidade do sêmen dos touros. Foram testadas as soluções com osmolaridade de 60, 100, 150 mOsm/kg e água destilada (19 mOsm/kg) com 15, 30 e 60 minutos de período de incubação a 37°C. Não foram verificadas diferenças significativas nos valores médios de espermatozóides reativos nas diferentes soluções e nos diferentes períodos, tanto no sêmen in natura quanto no sêmen congelado/descongelado. Assim, o tempo a partir de 15 minutos de incubação, com uma solução que varie a osmolaridade de 60 a 150 mOsm/kg, pode ser utilizada tanto no sêmen in natura quanto no sêmen congelado/descongelado.

Em bovinos não é observado, ainda, uma padronização no protocolo para a realização da técnica em relação ao tempo de incubação e a osmolaridade da solução a ser utilizada. Vários tempos de incubação em soluções hiposmóticas são relatados em estudos anteriores: 5 minutos (CORREA *et al.*, 1997), 20 minutos (TARTAGLIONE e RITTA, 2004), 30 minutos (MOCÉ e GRAHAM, 2008) e principalmente 60 minutos (BACINOGLU *et al.*, 2008; VERA-MUNOZ *et al.*, 2009). Em relação à solução hiposmótica, a osmolaridade de 150 mOsm/kg é a mais utilizada para a realização do

teste no sêmen *in natura* (REVELL e MRODE, 1994), e 100 mOsm/kg para o sêmen congelado/descongelado (REVELL e MRODE, 1994; CORREA e ZAVOS, 1994).

Cortés *et al.* (1993) indicam que nos primeiros 20 minutos do HOST ocorre a maior proporção de reação, por parte das células espermáticas, ao teste hiposmótico, não estando ainda definido o tempo mínimo de incubação para o espermatozóide reagir ao HOST. Correa e Zavos (1994) incubaram o sêmen bovino por 60 minutos em banho-maria a 37°C; Pinto e Lobo (1997) reduziram este tempo para 10 minutos; Lagares *et al.* (1998) utilizaram cinco minutos à temperatura ambiente; Melo e Henry (1999) e Bittencourt *et al.* (2005) retornaram para os 30 minutos a 37°C, Ferreira *et al.* (2001) compararam os percentuais de reação hiposmóticas encontrados, com o sêmen caprino, após os cinco e 25 minutos de incubação e Dell'aqua júnior *et al.* (2002) fizeram a leitura imediatamente após o sêmen equino ser misturado à solução hiposmótica.

A água foi indicada como uma solução hiposmótica para a realização do teste (LOMEO E GIAMBERSIO, 1991), e foi posteriormente utilizada por diversos autores (LAGARES *et al.*, 1998 ;DELL'AQUA JR. *et al.*, 2002; MELO *et al.*, 2003.; VASCONCELOS *et al.*, 2010). Alves *et al.*, 2005, testando a água e soluções de frutose e citrato de sódio de 100 mOsmol/L, consideraram que a água foi a melhor solução hiposmótica avaliada.

Usualmente, após a incubação com as soluções hiposmóticas, a reação é interrompida através da adição de formol salina. Embora o mecanismo de ação do formaldeído frente à unidade celular não esteja totalmente esclarecido, Mason e O'Leary (1991) observaram que o formaldeído, presente na solução de FST, atua junto aos microtubúlos ligando-se a α e β tubulina, despolimerizando a estrutura tubular, e desnaturando as proteínas presentes na membrana plasmática. A desnaturação protéica ocorrida, segundo análises de Zhu *et al.* (2002), promove alterações na permeabilidade da membrana dificultando ou impedindo o transporte de água para dentro da célula.

Talvez seja essa alteração na permeabilidade da membrana plasmática do espermatozóide, que justifique a não ocorrência de diferença ($P > 0,05$) nas médias entre as soluções, observadas por Alves *et al.* (2005b), dos espermatozóides reativos ao teste

HOST com ou sem fixação em FST pós-incubação. Sendo assim, a reação hiposmótica seria cessada quando fixada em formol salina.

3.3 Análise e contagem

A microscopia por contraste de fase é a mais indicada para a avaliação da reação espermática ao HOST. O aumento utilizado varia de 200 a 1.000 vezes (JEYENDRAN *et al.*, 1984; DELL'AQUA JÚNIOR *et al.*, 2002; FONSECA *et al.*, 2001; FERREIRA *et al.*, 2001), entretanto o uso de aumentos maiores, quando possível, como 1.250 vezes minimizam possíveis erros na leitura, principalmente nas alterações da morfologia da peça terminal, mais complicadas de serem avaliadas em pequenos aumentos Melo (1999).

A quantidade de células espermáticas contadas para a determinação do percentual à reação hiposmótica da amostra de sêmen, varia conforme diferentes pesquisadores. Jeyendran *et al.* (1984), não observou diferença significativa entre as avaliações que contaram 100 ou 200 espermatozóides por amostra. Nie e Wenzel (2001), não observaram diferença entre as contagens de 100 e 200 e entre 100 e 500 espermatozóides, com percentagens de $87,0 \pm 1,4$ x $87,1 \pm 1,4$ ($P=0,61$) e $84,3 \pm 1,0$ x $83,8 \pm 0,9$ ($P=0,24$), respectivamente.

A utilização de fórmulas para a correção dos resultados obtidos no teste hiposmótico com o intuito de diferenciar as alterações morfológicas na região da cauda do espermatozóide, provenientes de processos pré-ejaculatórios e/ou de falhas na realização de técnica das alterações provocadas pelo HOST, também foram referidas por diversos autores. Para tal, Jeyendren *et al.* (1984) propuseram uma fórmula matemática direta, na qual se multiplica o número de espermatozóides alterados após o HOST por cem e divide-se pelo total de espermatozóides contados na mesma área. Correa e Zavos (1994) e Vazquez *et al.* (1997) utilizaram uma fórmula similar, mas subtraíram do valor final a proporção de espermatozóides com cauda semelhante à reativa em uma amostra controle.

Com o intuito de melhorar essa metodologia de cálculo, Melo (1999), após observar que a incubação espermática em soluções isosmóticas, reproduzindo o ensaio

de Vazquez *et al.* (1997), não induzia mudanças significativas na morfologia da cauda, concluiu que a própria avaliação do sêmen para a morfologia espermática, poderia ser utilizada como grupo controle. Sendo assim, propôs uma fórmula matemática, na qual a porcentagem de reação hiposmótica é expressa por: $HO(\%) = (\% \text{ de alterações na região da cauda após o HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do HOST})$, sendo que possíveis resultados negativos são considerados iguais a zero.

Com o cálculo, Melo (1999) acredita ter minimizado significativamente o erro de leitura e interpretação dos resultados, simplificando ainda mais o HOST, aproximando-se do valor real de formas reativas, principalmente em ejaculados com elevada porcentagem de alterações na região da cauda antes do HOST.

As anormalidades de acrossoma e cabeça não necessitam serem incluídos na fórmula de cálculo de formas reativas ao teste hiposmótico devido o volume nesta região não aumentar tanto quanto o volume da região da cauda, que no espermatozóide bovino pode aumentar de 3,5 a 4 vezes (DREVIUS e ERIKSSON, 1966).

4 EXPERIMENTO REALIZADO

4.1 Introdução

Durante o século XX, a ovinocultura gaúcha apresentou grande destaque no cenário nacional na criação de ovinos. Entretanto, nas décadas de 80 e 90, devido à menor procura pela lã decorrente do advento dos materiais sintéticos, muitos criadores gaúchos deixaram de criar ovinos. Contudo, no final da década de 90 com o aumento da procura por carne ovina e o aumento significativo do seu preço no mercado nacional muitos criadores voltaram a criação. Segundo estudos realizados pelo Departamento de Produção Animal da Secretaria da Agricultura, Pecuária, Pesca e Agronegócio, a tendência é de aumento no rebanho ovino do Rio Grande do Sul. Sendo assim, a ovinocultura terá maior representatividade no mercado de carnes nacional, e é fundamental importância o acréscimo de tecnologias e procedimentos para aumentar a confiança nas avaliações andrológicas dos carneiros. É importante ressaltar que o teste hiposmótico ainda não possui um protocolo padrão estabelecido para ser utilizado como rotina na avaliação do sêmen ovino.

4.2 Objetivos

O presente estudo teve como objetivo testar diferentes soluções de citrato-frutose de várias osmolaridades: 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 e 290 mOsm/L., em pool de amostras de sêmen puro, coletadas por vagina artificial de dois reprodutores ovinos, para indicar a solução de maior grau de reação e acrescentar mais segurança aos protocolos de avaliação do sêmen ovino.

4.3 Material e Métodos

O trabalho foi realizado no laboratório de Inseminação Artificial da Universidade Federal do Rio Grande do Sul no período de 24 de março de 2011 a 26 de julho de 2011.

Para tanto, foram coletados dois carneiros maduros sem raça definida, por vagina artificial. Após a coleta, realizava-se o pool do sêmen dos carneiros. O sêmen foi avaliado, através do exame de motilidade, turbilhão, vigor, após diluição em solução de citrato de sódio a 2,94%. A avaliação foi realizada sob microscopia óptica. Para o exame hiposmótico, foram retirados 10 µl de sêmen puro e adicionados 2 mL de cada solução citrato-frutose de diferentes osmolalidades (50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250 e 290 mOsm/L), sendo a seguir incubados a 37° C por uma hora. Transcorrido o período de incubação, colocava-se 10µl de formol, com o intuito de paralisar a reação. A leitura das amostras foi realizada em microscopia de contraste de fase, contando-se 100 células por lâmina.

4.4 Resultado e Discussão

Neste estudo não se verificou diferença estatística significativa entre o número de caudas dobradas nas soluções de citrato-frutose de diferentes osmolaridades. Isto contraria as diversas observações de diferentes autores (SANTOS *et al.*, 2001; FONSECA *et al.* 2001, 2005). Diversas razões podem ter contribuído para ausência de variação entre as soluções: grande variabilidade entre as amostras; número de reprodutores utilizados; período de realização das coletas e ainda a não classificação do grau de dobramento (dobrada ou fortemente dobrada) da cauda do espermatozóide, sendo considerados reagentes os que apresentassem qualquer tipo dobramento de cauda.

5 CONCLUSÕES

O teste hiposmótico analisa um importante aspecto de qualidade dos espermatozoides, mas não é utilizado como rotina nas avaliações andrológicas devido a não existência ainda de um padrão a ser seguido, decorrente do grande número de soluções, tempos e temperaturas possíveis de serem utilizadas. Vários estudos devem ser realizados para melhor compreensão dos seus resultados, mas a falta de padronização da técnica é prejudicial para sua implementação nas análises andrológicas e nas avaliações de sêmen refrigerado e congelado.

Contudo, é importante ressaltar que a partir de uma definição de como a técnica deve ser realizada, esta poderá ser mais um teste seguro para ser utilizado em conjunto com outras técnicas para a avaliação do sêmen, pois nenhum teste isolado é capaz de prever ou assegurar a qualidade/fertilidade de amostras de sêmen.

REFERÊNCIAS

ALAVI, S.M.H.; PSENICKA, M.; POLICAR, T.; RODINA, M. HAMÁCKOVÁ J.; KOZÁK, P.; LINHART, O. Sperm quality in male *Barbus barbus* L. fed different diets during the spawning season. **Fish Physiol Biochem**, v. 35 p. 683-693, 2009.

ALAVI, S.M.H.; RODINA, M.; VIVEIROS, An T.M.; COSSON, J.; GELA, D; BORYSHPOLETS, S; LINHART, O. Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esox lucius* L.). **Theriogenology**, v. 72, p. 32–43, . 2009.

ALVES, S.G.G.; ALMEIDA, A.K.; BITTENCOURT, R.F.; PORTELA, A.P.M.; SNOECK, P.P.N.; MELO, M.I.V. Teste hiposmótico em sêmen congelado equino: efeito da associação de soluções e da água destilada. In. CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 16., 2005, Goiânia, GO. Anais em CD ROM: Resumo... Belo Horizonte, 2005a.

ALVES, S.G.G.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SNOECK, P.P.N.; CHALHOUB, M.; BITTENCOURT, R.F.; PORTELA, A.P.M.; ALMEIDA, A.K.; MELO, M.I.V.; HENRY, M. Efeito da solução, da fixação em formol-salina e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para o sêmen equino congelado. **Ciência Animal Brasileira**. v.6, n.3, p.219-225, 2005b.

AMARAL, F. ; OBERST, E. R. ; BORGES, A ; WASSERMANN, G F . Morfologia do espermatozóide de Jundiá em diferentes soluções.. In: XV Salão de Iniciação Científica e XII Feira de Iniciação Científica da UFRGS, 2003, Porto Alegre. Livro de Resumos do XV Salão de Iniciação Científica e XII Feira de Iniciação Científica da UFRGS, 2003.

AMMAN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation on stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v.7; p- 145-173, 1987.

- AMMANN, R. P.; GRAHAM, J. K. Spermatozoal function. In: McKinnon A. O.; VOSS, J. L. **Equine Reproduction**. 1 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993, p 715-745. and Bioxcell®. **Theriogenology**, v.71, p . 895 - 900 , 2009.
- BACINOGLU, S.; TAS, M.; CIRIT, U. et al. The potential fertility estimation capacity of the hypoosmotic swelling test, the thermal stress test and a modified cervical mucus penetration test in the bovine. **Animal Reproduction Science**, v. 104, p . 38 - 46, 2008.
- BRITO, L.F.C. ; BARTH, A.D. ; BILODEAU-GOESEELS, S. et al. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v. 60 , p . 1539 - 1551, 2003.
- CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; RIGAU, T.; BONET, S. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effect of ouabain. **Theriogenology**, v. 47, p. 765-784, 1997.
- CARDULLO, R.A.; WOLF, D.E.: The sperm plasma membrane: a little more than mosaic, a little less than fluid. In: BLOODGOOD, R.A., (Ed). **Structure and Function of Ciliary and Flagellar Surfaces**. Plenum Press: New York, p.305-336, 1990.
- CHRISTOVAN, Y.; JAMES, P.; MACKIE, A.; COOPER, T.G.; JONES, R. Molecular diffusion in sperm plasma membranes during epididymal maturation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.216, p.41-46, 2004.
- CORREA, J.R. ; ZAVOS, P.M. The hypoosmotic swelling test : it´s employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen - thawed bovine sperm membrane . **Theriogenology**, v. 42, p : 351 - 360 , 1994.
- CORREA, J.R.; PACE, M.M.; ZAVOS, P.M. Relationship among frozenthawed sperm characteristics assessed via routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination program. **Theriogenology**, v.48, p.721-731, 1997.
- CORTÉS, S.; NÚÑEZ, R. VAZQUEZ, I. Capacidad de reacción a endosmosis de los espermatozoides de macho cabrio. In. **Simpósio internacional de reprodução animal**, 5., 1993, Portugal. Anais... Portugal, 1993, v.2, p.225-22.

COSSON J, GROISON AL, SUQUET M, FAUVEL C, DREANNO C, BILLARD R. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. **J Appl Ichthyol**; v. 24:460–86, 2008.

COSSON MP, COSSON J, ANDRE´ F, BILLARD R. cAMP/ATP-dependence of movement in intact and demembrated trout spermatozoa. **Cell Motil Cytoskeleton**; v. 31:159 e 76, 1995.

CROSS, N. Role of cholesterol in sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v.59, p.7-11, 1998.

DELL’AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ZAHN, F.S; ALVARENGA, M.A.; LEONARDO, H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 26, n. 3, p. 189-191, 2002.

DREVIUS L., ERIKSSON H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa, **Experimental Cell Research**, 1966, 42: 136-5.

EDDY, E. M.; O’BRIEN, D. A. The spermatozoon. In: KNOBIL, E.; NEIL, J.D. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, 1994, p. 29-77.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; MAFFILI, V. V. et al. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. **Animal Reproduction**, v. 2, p. 139-144, 2005.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F.; 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, n. 3, p. 436-438, 2001.

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, n. 3, p. 436-457, 2001.

GARNER, D.L.; PINKEL, D.; JOHNSON, L.A.; PACE, M.M. Assessment of spermatozoal function using dual fluorescent staining and flow cytometric analyses.

Biology of Reproduction, v.24, p.127-18,1986.

GENNIS R. B. **Biomembranes: molecular structure and function**. New York: Springer, 1989. 533p.

HAMMERSTEDT, R. H; GRAHAN, J. K.; NOLAN, J. P. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask then to survive. **Journal of Andrology**, v.11, p. 73-88, 1990.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 88, p. 343-352, 1990.

HOLT, W.V. The sperm plasma membrane. In: international symposium on human sperm acrossome reaction, physiological and pharmacological induction and transduction pathways, 1995, France. **Proceedings...** France, 1995.

JAGER, S.; KREMER, J.; WIJCHMAN, J. Hypo-osmotic sperm swelling test does not assess fertilizing capacity of human spermatozoa. **Archives of Andrology**, v.26, p.195-197, 1991.

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

JOHNSON LA, WEITZE KF, FISER P, MAXWELL WMC. Storage of boar semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.143-172, 2000.

KUMI-DIAKA, J. Subjecting canine semen to the hypo-osmotic teste. **Theriogenology**, v. 39, p. 1279-1289, 1993.

LAGARES, M. A; PETZOLDT, R.; SIEME, H. et al. Preservação do sêmen fresco eqüino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, Porto Alegre, v. 26, n. 1, p. 29-42, 1998.

LENZI, A.; PICARDO, M.; GANDINI, L. et al. Lipids of the sperm plasma membrane: from polyunsaturated fatty acids considered as markers of sperm function to possible scavenger therapy. **Human Reproduction Update**, v.2, p.246-256, 1996.

LOMEO, A. M.; GIAMBERSO, A. M. “Water test”: a simple method to assess sperm-membrane integrity. **International Journal of Andrology**, v. 14, n.4, p. 278-282, 1991.

MARTINS, F. L., PINHO, O. R., PARAIZO, M.R., OLIVEIRA R.R., CASTILHO, F.E., GUIMARÃES, D.J. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.40, n.7, p.1519-1525, 2011.

MASON, J.T.; O’LEARY, T.J. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v.39, n.2 p.225-229, 1991.

MELO, M. I. V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen eqüino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51; p.71-78, 1999.

MELO, M.I.V. de. **Teste hiposmótico na avaliação do sêmen eqüino**. 1999. 67p. Tese (Doutorado em Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

MOCÉ, E; GRAHAM, J .K. In vitro evaluation of sperm quality. **Animal Reproduction Science**, v. 105 , p . 104 - 118 , 2008.

NIE, G. J.; WENZEL, J. G. W. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1005-1018, 2001.

PARKS, J. E.; GRAHAN, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

REVELL, S.G.; MRODE, R.A. An osmotic resistance test for bovine semen. **Animal Reproduction Science**, v. 36, p. 77 - 86, 1994.

SALGUEIRO, C.C. de M.; NUNES, J.F.; MATEOS-REX, E.; CORDEIRO, M.A.; MAGALHÃES, D.M.; CAVALCANTE, J.M.M; PALÁCIO, A.R.S. Avaliação da qualidade do sêmen caprino pós-descongelamento através do teste hiposmótico. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, 2003.

SANTOS, A.D.F; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F.; BORGES, A.M.; ROVAY, H.; GORETTI, R.G.; GUIMARÃES, J.D.; COSTA, E.P.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D.B.M. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.

SEKI, N., TOYAMA, Y., NAGANO, T. Changes in the distribution of filipinsterol complexes in the boar sperm head plasma membrane during epididymal maturation and in the uterus. **The Anatomical Record**, v.232, p.221-30, 1992.

SINGER, S. J., NICOLSON, G. L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science**, v.175, p.720-31, 1972.

SMITH, J. F.; MURRAY, G. R. Evaluation of different techniques for determination of membrane status in spermatozoa. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal Production**, v. 57, p. 246-250, 1997.

SOARES, F.A.C. ; STREIT JR, D. P. ; EBERT, A. R. ; COLDEBELLA, I. J. ; OBERST, E. R. . Parâmetros qualitativos do sêmen de jundiá (*Rhamdia quelen*) no

inverno e na primavera. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 17, p. 129/-133, 2010.

TARTAGLIONE CM, RITTA MN. Prognostic value of spermatological parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1245-1252, 2004.

VASCONCELOS, AB , M. A. SANTANA, MA; SANTOS, CMA M. M. SANTORO,MM;. LAGARES, M. A. Metabolic evaluation of cooled equine spermatozoa . **Andrologia**, v.42, p. 106–111, 2010

VERA-MUNOZ, O.; AMIRAT-BRIAND, L.; DIAZ, T. et al. Effect of semen dilution to low-sperm number per dose on motility and functionality of cryopreserved bovine spermatozoa using low density lipoproteins (LDL) extender : comparisonto Triladyl® and Bioxcell®. **Theriogenology**, v.71, p . 895 - 900 , 2009.

WATSON, P.F. Recents developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assesment of their postthawing function. **Reproduction Fertility and Development**, v.7, p.871-91, 1995.

WATSON, P.F. The effects of cold shock on sperm cell membranes In: MORRIS, E. J.; CLARK, A. (Eds). **The effects of low temperatures on biological membranes**. London: Academic Press, 1981. p.189-218.

WOLFE, C. A.; JAMES, P. S.; MACKIE, A. R. et al. Regionalized lipid diffusion in the plasma membrane spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 59; p. 1506-1514, 1998.

YEAGLE, P.L. Cholesterol and the cell membrane. **Biochemistry and Biophysics Acta**, v.822, p.267-87, 1985.

ZHU, F.; TAJKHORSHID, E.; SCHULTEN, K. Pressure-induced water transport in membrane channels studied bymolecular dynamics. **Biophysical Journal**, v.83, p.154-160, 2002.

ZÚCCARI, C.E.S.N. **Efeito da criopreservação sobre a integridade estrutural da célula espermática equina.** Botucatu, 1998. 118p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.