

Qual é o teste hiposmótico mais indicado para avaliar a integridade funcional de espermatozoides equino criopreservados?*

Paola Pereira das Neves Snoeck¹⁺, Maria Isabel Vaz de Melo², Sidney Gonçalves Gonzalez Alves³, Rodrigo Freitas Bittencourt⁴, Antônio de Lisboa Ribeiro Filho⁴, Marcos Chalhoub⁴ e Marc Henry⁵

ABSTRACT. Snoeck P.P.N., Melo M.I.V., Alves S.G.G., Bittencourt R.F., Ribeiro Filho A.L., Chalhoub M. & Henry M. [What is the most suitable hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of cryopreserved equine sperm?] Qual é o teste hiposmótico mais indicado para avaliar a integridade funcional de espermatozoides equino criopreservados? *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 36(4):355-361, 2014. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz, Rodovia Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. E-mail: paolasnoeck@uesc.br

The aim of this work was to standardize the most efficient hypoosmotic swelling test (HOST) to determine the percentage of functional integrity of cryopreserved equine sperm by testing protocols with different solutes and distilled water, different incubation times in water bath, osmolarities, dilution rates and with or without formol-saline fixation. In experiment 1 the sucrose, fructose, sodium chloride and sodium citrate solutions with 50 and 100 mOsmol/L and the distilled water were tested in the dilutions rate of 1:10 and 1:20, incubated in water bath for 10 and 15 minutes. The types of hypoosmotic reaction were evaluated in phase contrast microscopy. There were no differences ($P \geq 0.05$) between the incubation times, osmolarities of solutions, and dilution rates of the semen with distilled water. The fructose solution was more efficient to determine the percentage of reactive sperm ($P \leq 0.05$) than the sodium chloride and sodium citrate solutions, but was similar to sucrose and distilled water ($P \geq 0.05$). The test with distilled water identified the higher percentage of reactive sperm with strongly coiled tails compared to the tests with hypoosmotic solutions with 50 and 100mOsmol/L ($P \leq 0.05$). Experiment 2 tested the semen and distilled water dilutions to perform the HOST (1:5, 1:10, 1:15, 1:20 and 1:25). The 1:15 distilled water HOST was superior when compared to the other protocols ($P \leq 0.05$), and was similar to the 1:25 dilution protocol ($P \geq 0.05$). The effect of the saline-formol fixation was studied in experiment 3. The semen:distilled water dilution rate used was 1:15. After water bath incubation the sperm were immediately assessed or fixed for later analysis. There were no differences ($P \geq 0.05$) in the comparison between the fixed and non-

*Recebido em 6 de novembro de 2012.

Aceito para publicação em 4 de fevereiro de 2014.

¹ Médica-veterinária, Dra. Ciência Animal. Departamento de Ciências Agrárias e Ambientais, Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC), Rod. Jorge Amado, Km 16, Salobrinho, Ilhéus, BA 45662-000, Brasil. + Autora para correspondência, E-mails: paolasnoeck@uesc.br; paolasnoeck@gmail.com

² Médica-veterinária, Dra. Ciência Animal. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas), Campus Betim, Rua Rosário, 1081, Angola, Betim, MG 32604-115, Brasil. E-mail: bel.melo@terra.com.br

³ Médico-veterinário. União Metropolitana de Educação e Cultura (UNIME), Av. Luis Tarquínio Ponte, 600, Centro, Lauro de Freitas, BA 42700-000, Brasil. E-mail: alvessgg@hotmail.com

⁴ Médico-veterinário, Doutor. Universidade Federal da Bahia (UFBA), Av. Adhemar de Barros, 500, Ondina, Salvador, BA 40170-110, Brasil. E-mails: rfbvet1@yahoo.com.br; alisboafilho@uol.com.br; chalhoub@ufba.br

⁵ Médico-veterinário, Doutor. Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antonio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mail: henrym2601@gmail.com

-fixed protocol. The most efficient HOST to determine the percentage of functional integrity of cryopreserved equine sperm is carried out with 1:15 water distilled dilution (semen:distilled water), incubated for 10 minutes, fixed in saline-formol solution; the immediate reading is not necessary.

KEY WORDS. Sucrose, fructose, distilled water, osmolarity, semen, equine.

RESUMO. Objetivou-se padronizar um teste hiposmótico (HOST) mais eficiente em determinar o percentual de espermatozoides equino funcionalmente íntegros após a criopreservação, testando protocolos com solutos diferentes e água destilada, diferentes tempos de incubação em banho-maria, osmolaridades, taxas de diluição e fixação ou não em formol salino. No experimento 1 foram testadas as soluções de sacarose, frutose, cloreto de sódio e citrato de sódio com 50 e 100mOsmol/L e a água destilada nas diluições de 1:10 e 1:20, incubadas em banho-maria por 10 e 15 minutos. Os tipos de reação hiposmótica foram avaliados em microscopia de contraste de fase. Não houve diferença ($P \geq 0,05$) entre os tempos de incubação, as osmolaridades das soluções e as taxas de diluições sêmen e água destilada estudadas. A solução de frutose foi mais eficiente em determinar o percentual de espermatozoides reativos ($P \leq 0,05$) do que as soluções de cloreto e citrato de sódio, mas foi semelhante à solução de sacarose e água destilada ($P \geq 0,05$). O teste com água destilada identificou o maior percentual de espermatozoides reativos com cauda fortemente enrolada comparada aos testes com soluções hiposmóticas com 50 e 100mOsmol/L ($P \leq 0,05$). No experimento 2 foram testadas diferentes diluições sêmen e água destilada para realizar o HOST (1:5, 1:10, 1:15, 1:20 e 1:25). O HOST com água destilada na diluição 1:15 apresentou superioridade quando comparado aos demais protocolos ($P \leq 0,05$) e foi semelhante ao protocolo de diluição 1:25 ($P \geq 0,05$). O efeito da fixação em formol salino tamponada foi estudado no experimento 3. A taxa de diluição sêmen:água destilada utilizada foi 1:15, após incubação em banho-maria, os espermatozoides foram avaliados imediatamente ou submetidos a fixação para posterior leitura. Não houve diferença ($P \geq 0,05$) na comparação entre os espermatozoides fixados e não fixados. O HOST mais eficiente em determinar o percentual de espermatozoides equino funcionalmente íntegros após a criopreservação é o realizado com água destilada na diluição 1:15 (sêmen: água destilada), incubado por 10 minutos, fixado em formol salino, não sendo necessário a leitura imediata.

PALAVRAS-CHAVE. Sacarose, frutose, água destilada, osmolaridade, sêmen, equino.

INTRODUÇÃO

A integridade da membrana plasmática é de crucial importância para o funcionamento do espermatozoide e para o processo de fertilização. As membranas plasmática e acrossomal são essenciais para os processos de capacitação, de reação acrossomal, ligação com a zona pelúcida e de fusão dos gametas (Neild et al. 2000). Por isso, Jeyendran et al. (1984) desenvolveram o teste hiposmótico (HOST) para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática de espermatozoides humanos. Este teste baseia-se no transporte de fluídos através da membrana intacta sob condições hiposmóticas até que seja alcançado o equilíbrio osmótico entre os meios interno e externo. Esse transporte ocorre quando a integridade e a funcionalidade da membrana plasmática estão presentes. Essa atividade funcional da membrana plasmática está relacionada e pode ser utilizada como mais um indicador da habilidade fertilizante do espermatozoide (Neild et al. 2000).

O HOST é um protocolo de avaliação espermática acessível e simples de ser realizado e, tem sido empregado para avaliar a integridade de membrana de espermatozoides de várias espécies de mamíferos domésticos, como o bovino (Correa & Zavos 1994, Emerick et al. 2011, Martins et al. 2011), ovinho (Oberst et al. 2003, Moura et al. 2010), caprino (Fonseca et al. 2005), suíno (Vazquez et al. 1997), equino (Yavetz et al. 1995, Caiza de la Cueva et al. 1997, Neild et al. 1999, 2000, Melo et al. 2003, Alves et al. 2005), canino (Inamassu et al. 1999) e o coelho (Amorim et al. 2009). Entretanto, vários protocolos são empregados atualmente para tornar o HOST mais preciso em detectar o percentual de espermatozoides reativos e consequentemente funcionalmente íntegros. O soluto empregado na solução hiposmótica é um dos itens que mais diverge entre os pesquisadores. Outras características como tempo de incubação empregado no HOST, utilização da água destilada para realizar o teste, leitura do percentual de espermatozoides reativos e fixação das amostras incubadas com formol salino são estudadas, demonstrando que a técnica ainda não está totalmente padronizada.

Objetivou-se padronizar um teste hiposmótico mais eficiente em determinar o percentual de espermatozoides equino funcionalmente íntegros após

a criopreservação, testando protocolos com solutos diferentes e água destilada, osmolaridades, tempos de incubação em banho-maria, taxas de diluição e fixação em formol salino.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento 1

Vinte e quatro amostras de sêmen congelado de diferentes garanhões Mangalarga Marchadores foram utilizadas para avaliar o efeito de quatro soluções hiposmóticas e a água destilada, testando três osmolaridades e dois tempos de incubação. Três palhetas de 0,5mL foram descongeladas em banho-maria a 75°C por 7 segundos seguidos de imersão em banho-maria a 37°C por 30 segundos. Depois da descongelação, o conteúdo das palhetas foi colocado em microtubos para formar um pool. A motilidade e o vigor espermático das amostras descongeladas foram avaliados em microscópio óptico comum (Microscópio Olympus® CX21) de acordo com o preconizado pelo CBRA (1998) e foi retirada alíquota de sêmen para avaliação da morfologia espermática em preparação úmida. Desta forma, uma alíquota de sêmen foi fixada em formol salina tamponada de forma a turvar a amostra para posterior leitura das anormalidades espermáticas. A morfologia espermática foi avaliada em microscopia de contraste de fase, utilizando objetiva de imersão, no aumento de 1000X (Microscópio Olympus® CX31).

O HOST foi realizado incubando o sêmen descongelado em água destilada (osmolaridade zero) e também em quatro diferentes soluções hiposmóticas: sacarose, frutose, cloreto de sódio e citrato de sódio. As soluções hiposmóticas estudadas foram preparadas com osmola-

ridade de 50 e 100mOsmol/L. A osmolaridade das soluções foi avaliada em aparelho de precisão (m OSMETTE TM, Model 5004 Automatic Osmometer- Natick MA - EUA) baseado no ponto de congelação dessas soluções. O HOST foi realizado incubando uma alíquota de sêmen em nove alíquotas de água destilada (proporção 1:10), incubando uma alíquota de sêmen em dezenove alíquotas de água destilada (proporção 1:20) e incubando 50µL de sêmen em 500µL das soluções hiposmóticas estudadas, por 10 e 15 minutos em banho-maria a 37°C. Depois da incubação, todas as amostras foram fixadas com 250µL de formol salina tamponada, exceto as amostras incubadas na água destilada.

O percentual de espermatozoides reativos foi observado em microscopia de contraste de fase, na objetiva de imersão, no aumento de 1000X (Microscópio Olympus® CX31). Foram contadas 100 células e o percentual de espermatozoides reativos ao HOST foi calculado utilizando a fórmula de cálculo [Reativos ao HOST (%) = (% de alterações na região da cauda - defeitos de peça intermediária (PI), peça principal (PP) e peça terminal (PT) após o HOST) - (% de alterações na região da cauda - defeitos de PI, PP e PT antes do HOST)] descrita por Melo & Henry (1999). Os tipos mais frequentes de reação da cauda dos espermatozoides equino foi estudado posteriormente de forma a identificar o protocolo de HOST capaz de identificar o maior percentual de espermatozoides reativos (Figura 1).

Os dados foram submetidos à análise de variância para modelos lineares, com os tratamentos formados em esquema fatorial (soluções e tempos de incubação). O programa SPSS (Statistical Package of Social Science, versão 8.0, 1997) foi utilizado para análise estatística. As

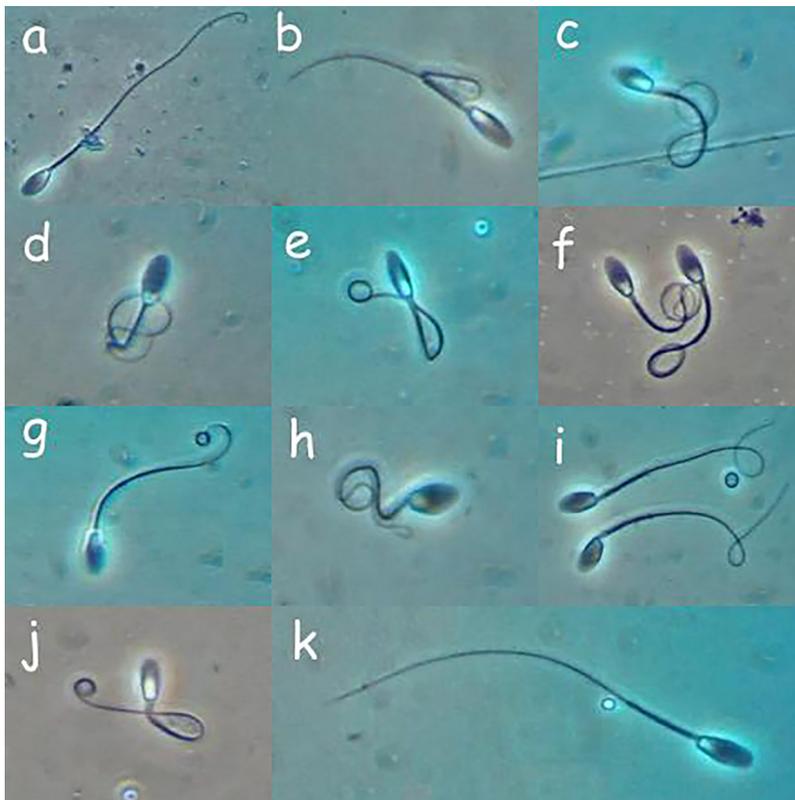


Figura 1. Espermatozoides equinos criopreservados submetidos ao HOST após a descongelação. Fotos: a, b, c, d, e, f, g, h, i, j - espermatozoides reativos ao HOST (indicação de integridade funcional da membrana plasmática da cauda); k - espermatozoide sem reação ao HOST (indicação de perda de integridade funcional da membrana plasmática da cauda). Microscopia de contraste de fase. Aumento 1000X. a e g = peça terminal reativa; b e i = peça principal reativa; c, d, e, f, h, j = cauda fortemente enrolada; k = não reativo.

médias foram comparadas pelo teste Tukey, ao nível de significância de 0,05.

Experimento 2

Utilizou-se neste experimento 23 doses de sêmen congelado provenientes de diferentes gananhões. As doses de sêmen foram descongeladas da mesma forma do experimento 1. Após a descongelação foi avaliado a motilidade e vigor espermáticos e retirada amostra para avaliação da morfologia espermática da mesma forma do experimento 1. Em seguida, amostras de sêmen de cada dose foram incubadas em banho-maria a 37°C por 10 minutos em diferentes proporções de sêmen/água destilada: 1:5, 1:10, 1:15, 1:20 e 1:25, para realizar o HOST. Foram contadas 100 células por amostra e o cálculo do percentual de células reativas foi realizado segundo Melo & Henry (1999).

O percentual de reações dos espermatozoides foi estudado por meio de análise de variância para medidas repetidas (cinco tratamentos no mesmo ejaculado/gananhão). Após a verificação da normalidade do modelo foi empregado o teste LSD (diferença mínima significativa) para comparação entre as médias de resultados do HOST, ao nível de significância de 0,05.

Experimento 3

Foram utilizadas 30 doses de sêmen congelado, provenientes de diferentes gananhões. As doses de sêmen foram descongeladas da mesma forma do experimento 1. Após a descongelação foi avaliado a motilidade e vigor espermáticos e retirada amostra para avaliação da morfologia espermática da mesma forma do experimento 1. Duas alíquotas de sêmen de cada amostra foram acrescidas de água destilada na proporção 1:15 e foram incubadas por 10 e 15 minutos em banho-maria a 37°C. Após o período de incubação, uma amostra foi avaliada, imediatamente, quanto ao percentual de espermatozoides reativos e a outra foi fixada com 50µL de formol salina tamponada para leitura até sete dias após este procedimento. Procedeu-se à leitura conforme Melo & Henry (1999). Os dados foram submetidos à análise de variância para modelos lineares, com os tratamentos formados em esquema fatorial (tempos de incubação e fixação ou não). As médias foram comparadas pelo teste "t de Student" ao nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

A motilidade espermática equina variou de 28,5%±15,3 a 32,8%±11,5 e o vigor espermático variou de 2,1±0,4 a 2,4±0,5 em todas as doses de sêmen descongeladas.

Registra-se que o tempo de incubação, as osmolaridades das soluções e as proporções de sêmen e água destilada estudadas não tiveram efeito significativo sobre o HOST. O percentual de reativos ao HOST na solução hiposmótica com frutose foi semelhante à solução de sacarose e o teste com água destilada ($P \geq 0,05$), mas diferiu das soluções citrato de sódio e cloreto de sódio. Verifica-se que o percentual de reativos foi semelhante nas soluções de sacarose, citrato de sódio e cloreto de sódio ($P \geq 0,05$; Tabela 1).

Desconsiderando a solução hiposmótica empregada, os tipos de reação mais frequentes (acima de 3%) foram peça principal enrolada (PPE), peça principal dobrada (PPD), reflexão de peça intermediária associado a peça terminal enrolada (PI + PT) e cauda fortemente enrolada (CFE). O total de formas reativas ao HOST variou pouco, independente do soluto ou osmolaridade utilizada. No entanto, o percentual de CFE foi significativamente maior na água destilada e decaiu significativamente nas soluções de 50 para 100mOsmol/L. Para uma mesma osmolaridade não houve diferença na porcentagem de CFE entre soluções (Tabela 2).

Os HOST que utilizaram as proporções de água destilada 1:15 e 1:25 apresentaram superioridade quando comparado aos demais protocolos ($P \leq 0,05$; Tabela 3). Observou-se um grau de associação entre essas proporções estudadas ($r=0,583$; $P \leq 0,01$).

Não foi observada diferença ($P \geq 0,05$) entre o percentual de espermatozoides reativos ao HOST entre as amostras fixadas em formol salina tampoadas após incubação de 10 ou 15 minutos em banho-maria (15,7±14,7 e 17,2±14,6; respectivamente)

Tabela 1. Percentual de espermatozoides equino reativos ao HOST, após a criopreservação, com uso de diferentes soluções, água destilada, diferentes osmolaridades e tempos de incubação.

Tempo de incubação / Solução	Osmolaridade				Média ±DP
	50 mOsmol/L		100 mOsmol/L		
	10'	15'	10'	15'	
Frutose	15,3±12,4	14,1±11,6	15,2±12,6	13,7±13,2	14,5±12,3 ^a
Sacarose	12,0±12,0	12,7±12,2	14,2±13,1	11,2±10,0	12,5±11,8 ^{ab}
Citrato de sódio	10,7±10,5	9,5±9,6	10,3±11,0	10,2±11,0	10,3±10,4 ^b
Cloreto de sódio	11,5±11,4	9,9±10,7	11,0±11,5	11,4± 10,5	11,0±10,9 ^b
Taxa de diluição					
	1:10		1:20		
Tempo de incubação	10'	15'	10'	15'	Média±DP
Água destilada	12,8±13,0	10,4±10,7	12,9±11,4	11,0±10,9	11,9±11,5 ^{ab}

Médias com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$). DP = desvio padrão.

Tabela 2. Efeito de soluções hiposmóticas com diferentes osmolaridades e a água destilada nas formas de reação ao HOST de espermatozoides equino após a criopreservação.

Solução hiposmótica	PPE(%)	PPD(%)	PI+PT(%)	CFE(%)	Total(%)
Frutose 100 mOsmol/L	4,2±2,8	6,1±5,4	7,9±6,6	8,5±6,7 ^c	33,6±16,6 ^a
Sacarose 100 mOsmol/L	3,1±2,2	5,7±5,1	7,9±6,3	7,4±5,6 ^c	30,7±15,2 ^{abc}
Citrato de sódio 100 mOsmol/L	2,2±1,4	6,1±5,7	6,2±5,4	7,5±5,7 ^c	28,1±13,4 ^c
Cloreto de sódio 100 mOsmol/L	3,5±2,7	6,0±6,2	6,8±5,0	9,2±6,8 ^c	29,1±13,7 ^{bc}
Frutose 50 mOsmol/L	3,2±2,2	4,2±3,4	3,3±2,8	16,4±12,9 ^b	32,6±15,6 ^c
Sacarose 50 mOsmol/L	3,6±2,6	5,1±4,0	3,6±3,6	14,9±13,1 ^b	30,6±16,1 ^{abc}
Citrato de sódio 50 mOsmol/L	2,3±1,3	3,8±3,5	3,1±3,1	13,9±10,9 ^b	27,7±13,6 ^c
Cloreto de sódio 50 mOsmol/L	3,3±2,3	3,7±3,6	3,6±3,3	14,4±9,1 ^b	28,8±13,8 ^c
Água destilada 1:10	4,9±3,7	3,6±3,6	3,0±3,1	24,9±15,9 ^a	33,1±14,5 ^a
Água destilada 1:20	4,1±3,4	3,2±2,6	2,7±2,7	25,0±15,4 ^a	32,4±14,2 ^{ab}

Médias com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$). PPE – peça principal enrolada; PPD – peça principal dobrada; PI + PT – dobramento/enrolamento da peça intermediária e peça terminal; CFE – cauda fortemente enrolada.

Tabela 3. Percentual de espermatozoides equino reativos ao HOST da água destilada após a criopreservação.

Taxa de diluição	1:5	1:10	1:15	1:20	1:25
Média ± DP	19,4±2,5 ^c	23,0±2,5 ^{bc}	31,5±3,6 ^a	21,5±2,8 ^c	27,4±3,3 ^{ab}

Médias com diferentes sobrescritos diferem ($P < 0,05$). DP = desvio padrão.

e as não fixadas em formol salina tamponada submetidas aos mesmos tempos de incubação (11,2 ± 12,9 e 13,1 ± 13,9; respectivamente).

DISCUSSÃO

O teste hiposmótico realizado com soluções à base de eletrólitos (citrato e cloreto de sódio) se mostrou menos eficiente na identificação do percentual de espermatozoides equinos reativos e, conseqüentemente, funcionalmente íntegros após a criopreservação. Neild et al. (1999) também relataram que o citrato de sódio entre 25 e 100mOsmol/L não foi uma solução hiposmótica eficiente em detectar espermatozoides equino íntegros. Embora, para espermatozoides humanos *in natura*, o teste hiposmótico utilizando solução de cloreto de sódio a 150mOsmol/L seja mais sensível em detectar a funcionalidade da membrana plasmática (Tsai et al. 1997). Possivelmente, o teste hiposmótico para sêmen equino congelado tenha que empregar água destilada ou soluções de açúcares tendo em vista a característica do transporte de água através da membrana plasmática do espermatozoide desta espécie (Neild et al. 1999, Zhu et al. 2002).

O teste hiposmótico utilizando água destilada também se mostrou capaz de identificar o percentual de espermatozoides com membrana plasmática funcionalmente íntegra assim como o teste hiposmótico que empregou soluções de açúcares (sacarose e frutose 50 e 100mOsmol/L). Com uma

vantagem para o teste com a água destilada que não necessita do preparo de uma solução hiposmótica com avaliação posterior da osmolaridade, o que torna o teste mais simples e fácil para ser empregado na rotina dos laboratórios de andrologia (Bahamondes et al. 2001) e pelos veterinários de campo (Dell'Aqua et al. 2002). Além disso, no teste com a água destilada é possível identificar uma maior porcentagem de espermatozoides com cauda fortemente enrolada, reação espermática ao HOST mais fácil de ser identificada durante a avaliação em microscopia óptica comum, no aumento de 400X e em microscopia de contraste de fase, no aumento de 400 e 1000X. Esta reação espermática ao HOST pode ser mais evidente dependendo da solução hiposmótica e da osmolaridade utilizada (Fonseca et al. 2005, Amorim et al. 2009).

As pesquisas têm mostrado que o tempo de incubação não influi no resultado do percentual de formas reativas após o HOST (Melo et al. 2003, Alves et al. 2005, Martins et al. 2011), mesmo quando soluções hiposmóticas são substituídas pela água destilada. Pode-se destacar, então, a vantagem de cada laboratório de tecnologia de sêmen poder escolher o tempo de incubação mais apropriada às suas condições de trabalho, porém, os mesmos devem cuidar para que o HOST permaneça por um período mínimo de 10 minutos em banho-maria. A leitura imediata do HOST pode comprometer o percentual de células reativas (Melo et al. 2003).

A proporção de água destilada de 1:15 no teste hiposmótico permitiu uma facilidade maior de leitura em comparação com a proporção 1:25, pois neste caso, não foi observado efeito diluição das amostras o que tornou a contagem das 100 células mais fácil e menos demorado. A osmolaridade final

da solução sêmen:água destilada, nesta proporção, foi de 70mOsmol/L, permanecendo dentro da osmolaridade considerada ideal para o HOST, segundo alguns autores (Melo & Henry 1999, Neild et al. 1999, Lagares et al. 2000, Martins et al. 2011).

Embora o mecanismo de ação do formaldeído frente à unidade celular não esteja totalmente esclarecido, Mason & O'Leary (1991) observaram que, o formaldeído, presente na solução de formol salina, atua junto aos microtúbulos ligando-se a α e β tubulina, despolimerizando a estrutura tubular e desnaturando as proteínas presentes na membrana plasmática. Essa desnaturação protéica, segundo análises de Zhu et al. (2002), promove alterações na permeabilidade da membrana dificultando ou impedindo o transporte de água para dentro da célula. Baseando-se nesta hipótese, a reação hiposmótica seria cessada quando fixada em formol salina e, por isso, não foi observado diferença ($P \geq 0,05$) entre o teste com água destilada fixado e não fixado. É importante salientar que as leituras foram realizadas até sete dias depois da fixação das amostras. No entanto, esses resultados contradizem os obtidos em pesquisas anteriores realizadas pelo nosso grupo de pesquisadores. É possível que o maior número de variáveis estudadas nas pesquisas anteriores tenha favorecido o erro da análise, impedido que o efeito da fixação fosse realmente avaliado.

CONCLUSÃO

Para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática de espermatozoides equino criopreservados os testes utilizando soluções hiposmóticas de sacarose e frutose com 50 e 100mOsmol/L e a água destilada são mais eficientes. Entretanto, pela facilidade de execução deve-se optar pelo protocolo mais simples utilizando somente água destilada para a realização do teste hiposmótico para espermatozoides equino criopreservados.

Para o teste com água destilada é indicada uma diluição de 1:15 e tempo de incubação de 10 minutos.

A fixação em formol salina tamponada deverá ser realizada no teste hiposmótico que utiliza soluções hiposmóticas para aumentar o tempo de armazenamento antes da leitura do percentual de espermatozoides reativos. Para o teste com água destilada, este tempo de armazenamento deverá ser inferior a sete dias.

Agradecimentos. Ao laboratório de Reprodução Animal da Escola de Veterinária da UFMG pelo suporte financeiro, técnico e recursos humanos durante o pro-

cesso de congelamento do sêmen equino. Ao laboratório de Reprodução Animal da Escola de Medicina Veterinária da UFBA pelo suporte técnico e recursos humanos disponíveis durante o processo de descongelamento e avaliação do sêmen.

REFERÊNCIAS

- Alves S.G.G., Ribeiro Filho A. de 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 sêmen equino congelado. *Cienc. Anim. Bras.*, 6:219-225, 2005.
- Amorim E.A.M., Torres C.A.A., Graham J.K., Amorim L.S. & Santos L.N.L. The hypoosmotic swelling test in fresh rabbit spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.*, 111:338-343, 2009.
- Bahamondes L., Fazano F., Lucio M.A. de, Neves P.A., Bottcher Luiz F. & Lorenzetti G.B. Evaluation of human sperm membrane integrity using the water test and hypoosmotic test. *Andrologia*, 33:75-77, 2001.
- CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. 2ª ed. CBRA, Belo Horizonte, 1998. 49p.
- Correa J.R. & Zavos P.M. The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42:351-360, 1994.
- Dell' Aqua J.A., Papa F.O., Zahn F.S., Alvarenga M.A. & Leonardo H. Novo teste de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 26:189-191, 2002.
- Emerick L.L., Dias J.C., Vale Filho V.R., Silva M.A., Andrade V.J., Leite T.G. & Martins J.A.M. Avaliação de integridade de membrana de espermatozoides bovino criopreservado para prever o índice de prenhez. *Cienc. Anim. Bras.*, 12:536-546, 2011.
- Fonseca J.F., Torres C.A.A., Maffili V.V., Borges A.M., Santos A.D.F., Rodrigues M.T. & Oliveira R.F.M. The Hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim. Reprod.*, 2:139-144, 2005.
- Inamassu A., Uechi E. & Lopes M.D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 23:302-303, 1999.
- Jeyendran R.S., Van der Ven H.H., Perez-Pelaez M., Crabo B.G. & Zaneveld L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fertility*, 70:219-228, 1984.
- Lagares M.A., Petzoldt R., Sieme H. & Klug E. Assessing equine sperm-membrane integrity. *Andrologia*, 32:163-167, 2000.
- Martins L.F., Pinho R.O., Paraizo R.M., Oliveira R.R., Castilho E.F. & Guimarães J.D. Avaliação de diferentes osmolaridades de soluções hiposmóticas e tempos de incubação no teste hiposmótico do sêmen de touros Nelore. *Rev. Bras. Zootec.*, 40:1519-1525, 2011.
- Mason J.T. & O'Leary T.J. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. *J. Histochem. Cytochem.*, 39:225-229, 1991.
- Melo M.I.V. & Henry M. Teste hiposmótico na avaliação de sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 51:273-276, 1999.
- Melo M.I.V., Snoeck P.P.N., Bispo C. & Henry M. Efeito da solução e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para o sêmen equino congelado. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 27:379-380, 2003.
- Moura L.C.O., Silva M.C. & Snoeck P.P.N. Diferentes soluções de teste hiposmótico para sêmen ovino. *Rev. Bras. Med. Vet.*, 32:146-150, 2010.
- Neild D.M., Chaves M.G., Flores M., Mora N., Beconi M. & Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology*, 51:721-727, 1999.
- Neild D.M., Chaves M.G., Flores M., Miragaya M.H., Gonzalez E. & Agüero A. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. *Andrologia*, 32:351-355, 2000.

- Oberst E.R., Jobim M.I.M., Mattos R.C., Kroth E., Lara G., Smiderie W. & Bronzatto M. Teste hiposmótico e sua relação com outros métodos da avaliação da integridade da membrana espermática do carneiro. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 27:375-376, 2003.
- Tsai Y., Liu J., Garcia J.E., Katz E., Compton G. & Baramki T.A. Establishment of an optimal hypo-osmotic swelling test by examining single spermatozoa in four different hypoosmotic solutions. *Human Reprod.*, 12:1111-1113, 1997.
- Vazquez J.M., Martinez E.A., Garcia-Artiga C. & Roca J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analyzing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47:913-922, 1997.
- Yavetz H., Hauser R., Yogev L., Botchan A., Lessing Z., Homonnai T. & Paz G. Advanced methods for evaluation of sperm quality. *Andrologia*, 27:31-35, 1995.
- Zhu F., Tajkhorshid E. & Schulten K. Pressure-induced water transport in membrane channels studied by molecular dynamics. *Biophysical J.*, 83:154-160, 2002.