

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Uso do teste hiposmótico na avaliação de sêmen dos animais domésticos

Bianca de Sousa Alencar

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

MONOGRAFIA

Uso do teste hiposmótico na avaliação de sêmen dos animais domésticos

Bianca de Sousa Alencar
Graduanda

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

Patos
Agosto de 2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSTR

A368u Alencar, Bianca de Sousa
Uso do teste hiposmótico na avaliação de sêmen dos animais domésticos /
Bianca de Sousa Alencar. – Patos, 2016.
23f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Medicina Veterinária) - Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2016.

“Orientação: Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro”

Referências.

1. Sêmen. 2. Teste hiposmótico. 3. Membrana plasmática. I. Título.

CDU 636.082

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CAMPUS DE PATOS – PB
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA

BIANCA DE SOUSA ALENCAR
Graduanda

Monografia submetida ao Curso de Medicina Veterinária como requisito parcial para obtenção do grau de Médica Veterinária.

APROVADO EM/...../.....

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Enrique Peña Alfaro

Prof. Dr. Severino Silvano dos Santos Higinio

Med. Vet. MSc. Rodrigo Barbosa Palmeira

*A todos os meus familiares. especialmente à minha amada filha Júlia Maria que me torna a cada dia a mãe mais feliz. minha querida mãe Russia Lião e meu querido pai Josimar Alencar que me ensinaram os valores da vida. minha querida irmã Lívia Alencar a quem eu amo muito. e meu amado esposo Alisson Kemis que esteve comigo nos momentos mais felizes e nos mais desafiadores.
Dedico com amor.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por abençoar a mim e a minha família, por essa conquista e permitir que este sonho se realize.

A meus pais por batalharem tanto quanto lhes era possível para que este sonho se realizasse. Por todo amor, sabedoria e conforto que me foi dado. Amo vocês de todo meu coração! Sem vocês eu não estaria aqui hoje.

A minha querida irmã por me apoiar nos momentos mais difíceis, por compartilhar comigo, durante a vida, os momentos mais felizes. Amo-te!

A meu querido esposo por estar ao meu lado em todos os momentos. Por me permitir sonhar. Por dar meu maior e mais lindo presente... Nossa filha. Amo-te!

Filha, mamãe agradece simplesmente por você existir. És meu amor maior, meu tudo. Mamãe ama muito... Júlia Maria!

A todos os funcionários da UFCG, terceirizados ou não. Vocês tornam o nosso dia a dia possível. Muito obrigada!

A todos os professores, nossos queridos mestres, que me formaram uma profissional dedicada e bem instruída.

Em especial ao meu querido orientador Carlos Peña que me ensinou muito e se fez presente em muitos momentos. És uma pessoa muito sábia e de bom coração. Obrigada por toda paciência e carinho!

Todos os familiares direta ou indiretamente, muito obrigada por estarem presente em minha vida.

Todos os amigos que me acompanharam durante a vida e que fiz durante o curso, amo todos vocês, muito obrigada!

À todos os animais por deixarem a mim e a meus colegas cuidarem de vocês, permitindo-lhes uma vida plena, cheia de saúde, amor e carinho. Sem vocês nós não saberíamos o que é o amor incondicional.

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Morfologia espermática e seu metabolismo	11
2.2 Teste hiposmótico (HOST)	12
2.3 Soluções hiposmóticas e osmolaridade	15
2.3.1 Tempo de incubação e fixação com formol-salina tamponada	18
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	19
4 REFERÊNCIAS	20

LISTA DE FIGURAS

	Pág
Figura 1 - Espermatozoides equinos criopreservados submetidos ao HOST após a descongelação.....	14

RESUMO

ALENCAR, BIANCA DE SOUSA. Uso do teste hiposmótico na avaliação de sêmen dos animais domésticos. Patos, UFCG. 2016. 23f. (Trabalho de conclusão de curso de Medicina Veterinária).

O presente trabalho enfoca uma revisão sobre o teste hiposmótico nas células espermáticas de animais domésticos, como importante ferramenta na avaliação da qualidade de sêmen, através das modificações morfofuncionais que ocorrem nas células espermáticas ao entrarem em contato com soluções hiposmóticas. Células com integridade de membrana plasmática reagem ao teste por meio de edema, que irá causar dobramento na cauda do espermatozoide, isto ocorre pela passagem do líquido para o interior das mesmas, aumentando seu volume celular (edema). O presente teste tem sido utilizado como indicador de fertilidade em diversas espécies, equinos, caprinos, ovinos, caninos, humanos entre outros, uma vez que avalia a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides. Somente células com integridade de membrana apresentam vitalidade funcional para os movimentos espermáticos e o processo de penetração do óvulo e fertilização.

Palavras-chave: Sêmen, teste hiposmótico, membrana plasmática.

ABSTRACT

ALENCAR, BIANCA DE SOUSA. Use of the hiposmotic test on semen evaluation of domestic animals. Patos, UFCG. 2016. 23f. (Conclusion work of the Veterinary Medicine course).

The aim of this review is to study the hiposmotic test in sperm cells of domestic animals as an important tool in the evaluation of semen quality, through morphological and functional changes that occur in sperm cells on contact with hiposmotic solutions. Cells with plasma membrane integrity test to react by swelling, which will cause bending of the sperm tail, this occurs by the passage of the liquid to the inside of same, increasing its cell volume (edema). This test has been used as an indicator of fertility in several species, equine, caprine, ovine, canine, human among other since it evaluates the functional integrity of the sperm plasma membrane. Only cells with membrane integrity have functional vitality for sperm movement and penetration process and egg fertilization.

Keywords: semen, hiposmotic test, sperm plasm membrane.

1 INTRODUÇÃO

Um dos aspectos relevantes no sucesso da inseminação artificial, por exemplo, em qualquer espécie é a manutenção das qualidades fertilizantes dos espermatozoides após os diversos passos da tecnologia do sêmen, em especial o contato com os diluentes utilizados e as variações de temperatura a que estes são submetidos. Para isto, a avaliação do sêmen deve ser rigorosa, sistemática e objetiva visando obter um diagnóstico da capacidade de fertilização dos espermatozoides. Além dos exames de rotina, de forma prática e de baixo custo pode-se avaliar a integridade da membrana plasmática das células espermáticas através do teste hiposmótico. Este exame fornecerá importantes informações sobre a qualidade seminal e sua interação com a metodologia e diluentes utilizados.

No início de seu desenvolvimento, o teste hiposmótico foi utilizado para avaliar os espermatozoides humanos, que tinha o objetivo analisar a viabilidade funcional da membrana espermática. Desde então, têm sido utilizado em diferentes espécies animais.

O teste consiste em observar edema no espermatozoide, que irá causar em sua cauda. É realizado, adicionando solução hiposmótica às células, que irá permitir a passagem do líquido para o interior das mesmas, aumentando seu volume celular. O presente teste tem sido utilizado como indicador de fertilidade, pois avalia a integridade funcional da membrana plasmática (PEÑA ALFARO, 2016).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morfologia espermática e seu metabolismo

Os espermatozoides são células especializadas produzidas pelos testículos que apresentam grande importância biológica por serem portadores do material genético masculino, necessário para transferência dos caracteres hereditários no momento da singamia, logo após a fecundação (PEÑA-ALFARO, 2016). Os espermatozoides são compostos por uma cabeça de perfil fino, que comporta o núcleo com sua cromatina altamente condensada compreendida por um número haploide de cromossomos, peça intermediária, que contém as mitocôndrias geradoras da energia necessária para a movimentação e metabolismo, e a cauda, responsável pela motilidade celular. O espermatozoide é completamente envolto pela membrana plasmática.

A cabeça do espermatozoide tem forma oval e é quase totalmente ocupada pelo núcleo, composto de cromossomos paternos. Na parte superior da cabeça há o acrossoma, oriundo da junção de vesículas do aparelho de Golgi e que consiste em uma bolsa cheia de enzimas com a função de facilitar a penetração do espermatozoide no óvulo durante a fecundação. O colo, também chamado de peça intermediária, contém mitocôndrias que produzem o trifosfato de adenosina (ATP), essencial para o movimento dos flagelos. Já a cauda ou flagelo desenvolve-se a partir do centríolo e tem a função de impulsionar o espermatozoide pelo aparelho reprodutor feminino. No momento da ejaculação, os espermatozoides se unem ao plasma seminal, fluido produzido pelas glândulas sexuais anexas. (GARNER; HAFEZ, 2003).

O plasma seminal constitui o principal meio nutriente dos espermatozoides ao serem depositados no trato genital das fêmeas, e terão sua capacidade de fecundação mantida na maioria das espécies, até por 48 horas, com exceção do cão que pode alcançar mais de 100 horas de viabilidade (PEÑA ALFARO, 2016).

Moraes (2016) relata que nos mamíferos, a membrana plasmática dos espermatozoides possui proteínas chamadas de fertilizinas. É através dessas proteínas que o espermatozoide consegue se ligar às proteínas receptoras presentes na membrana do óvulo. Quando as proteínas dos dois gametas se associam, ocorre uma fusão entre elas que causa alteração na permeabilidade da membrana ovular aos íons Na^+ e K^+ , promovendo despolarização de toda a superfície do óvulo. Essa alteração na superfície da membrana do óvulo impede a penetração de outros espermatozoides, garantindo que apenas um fecunde o óvulo.

O acrossoma cobre a cabeça do espermatozoide e consiste numa estrutura fina, com dupla camada de membranas que envolvem intimamente o núcleo espermático. Esse acrossoma contém diversas enzimas hidrolíticas necessárias ao processo de penetração no oócito, e liberadas ao iniciar-se a reação de acrossoma, durante o contato do espermatozoide com o *cumulus ooforos*, e sequencial passando pela corona radiata e zona pelúcida (BRINSKO, 1999; PEÑA-ALFARO, 2016).

A peça intermediária apresenta-se como uma estrutura flagelar do tipo 9+ (9+2), isto é: nove fibras densas que circundam nove pares de microtúbulos, e estes envolvem dois filamentos simples de microtúbulos. O axonema é composto pela estrutura 9+2 de microtúbulos sendo recoberto, junto com as fibras que o circundam, por uma bainha em forma de hélice composta por numerosas mitocôndrias (JASKO, 1992).

Os espermatozoides são células capazes de efetuar trocas metabólicas com o meio onde se encontram e essas trocas são facilitadas pelo caráter filiforme do espermatozoide, gerando energia, o qual lhe confere grande permeabilidade (MIES FILHO, 1987).

2.2 Teste hiposmótico (HOST)

A integridade da membrana plasmática é de crucial importância para o funcionamento do espermatozoide e para o processo de fertilização. As membranas, plasmática e acrossoma, são essenciais para os processos de capacitação, de reação acrossomal, ligação com a zona pelúcida e de fusão dos gametas (NEILD et al., 2000).

A membrana plasmática está envolvida com trocas metabólicas com o meio extracelular assumindo assim grande importância na biologia espermática e na funcionalidade da mesma. Sua avaliação, somado aos parâmetros tradicionais de avaliação da qualidade do sêmen, com a finalidade de aumentar os índices de fertilidade, torna-se relevante, (LAGARES et al., 1998).

A integridade da membrana plasmática celular pode ser avaliada utilizando diversas técnicas, entre as quais o uso de corantes supra vitais, a exemplo da eosina/nigrosina ou o *trypan-blue*, usados para verificar a integridade física da membrana plasmática do espermatozoide (BRITO et al., 2003).

Colorações fluorescentes foram desenvolvidas com a mesma finalidade, principalmente para o uso com sêmen descongelado, ou seja, espermatozoides criopreservados. Entre estes corantes podemos citar o Iodeto de propídio (IP) que é um corante DNA-específico, cora de vermelho fluorescente somente os espermatozoides com dano na membrana plasmática. Já o diacetato de carboxifluoresceína (CDFA), que pode ser combinado ao IP na avaliação da

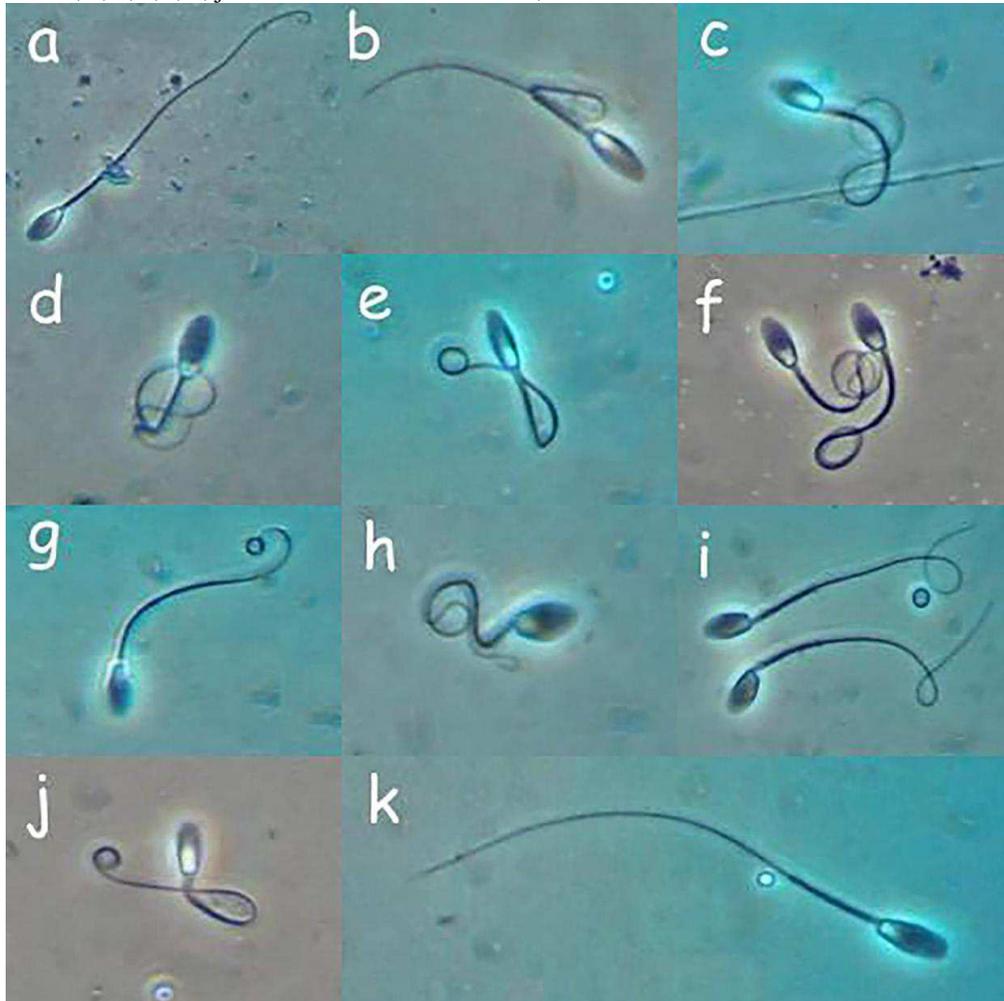
integridade da membrana espermática, irradia uma coloração verde fluorescente ao sofrer hidrólise quando penetra em um espermatozoide com membrana plasmática intacta (HARRISON; VICKERS, 1990). A dificuldade a campo do uso destas técnicas radica na necessidade de um microscópio de fluorescência.

Na avaliação das técnicas da integridade de membrana deve-se considerar que a mesma por si só, não é suficiente para prever a possível capacidade fertilizante da célula espermática, pois outros fatores metabólicos relacionados à funcionalidade bioquímica da membrana plasmática possibilitam ao espermatozoide desencadear todo o processo de penetração/fertilização (JAGER et al, 1991).

Jeyendran et al.(1984), propuseram a utilização do teste hiposmótico ou HOST (*Hypoosmotic Swelling Test*) na avaliação da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide humano.

A membrana plasmática da célula espermática possui a capacidade de transporte seletivo de moléculas, quando exposta a uma condição de baixa osmolaridade, a água penetra no interior dos espermatozoides para atingir o equilíbrio osmótico (INAMASSU; UECHI; LOPES, 1999). Este fenômeno leva a aumentar o volume das células e a membrana plasmática se expande. O espermatozoide ao ser submetido ao choque hiposmótico tende a promover um dobramento de cauda (Figura 1). Estas modificações levam a indicar que essa célula espermática apresentava integridade da sua membrana plasmática, (DELL'AQUA JÚNIOR et al, 2002).

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.



Fonte: Snoeck et al., (2014)

Alterações morfofuncionais da cauda de espermatozoides submetidos à manipulação, podem levar a falsas interpretações sobre a integridade da membrana espermática, pelo qual foram propostas diversas formulas de ajuste, a exemplo de Jeyendran et al (1984) que propuseram uma fórmula matemática direta, na qual se multiplica o número de espermatozoides alterados após o HOST por cem e divide-se pelo total de espermatozoides contados na mesma área. Vazquez et al (1997) utilizaram uma fórmula semelhante, mas subtraíram do valor final a proporção de espermatozoides com cauda semelhante à reativa em uma amostra controle, Já Peña Alfaro (2016) sugere avaliar as alterações de cauda nos espermatozoides antes da avaliação do HOST e este valor ser subtraído ao valor encontrado após a incubação do sêmen com a solução hiposmótica, com resultado expresso em percentual.

Considerando que a cabeça do espermatozoide, mesmo sendo recoberta pela membrana plasmática, não aumenta tanto o seu volume em condições hiposmótica, como acontece com volume da cauda, não se leva em consideração na avaliação das alterações de cabeça espermática ao realizar o HOST (DREVIUS e ERIKSSON, 1966), este fato, segundo Melo (1999), indica a não necessidade da inclusão das anormalidades de acrossoma e cabeça na fórmula de cálculo de formas reativas ao HOST.

A microscopia por contraste de fase é a mais indicada para a avaliação da reação espermática ao HOST, e diversos autores propuseram o uso de aumento variando entre 200 e 1.000 vezes (JEYENDRAN et al, 1984; FONSECA et al, 2001; FERREIRA et al, 2001; DELL'AQUA JÚNIOR et al, 2002; ANDRADE & PEÑA ALFARO, 2007).

O número de células espermáticas a serem contadas visando determinar percentualmente a reação hiposmótica da amostra de sêmen, varia conforme os pesquisadores. Jeyendran et al (1984), não observou diferença significativa entre as avaliações que contaram 100 ou 200 espermatozoides por amostra. Nie e Wenzel (2001), também não observaram essa diferença entre as contagens de 100 e 200 e entre 100 e 500 espermatozoides, com porcentagens 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.

O uso do teste hiposmótico no sêmen de ovinos oferece boa condição de análise da integridade da membrana plasmática na comparação do uso de diferentes diluentes e horários pós-diluição, recomendando o seu uso de forma rotineira nos processos de tecnologia de sêmen ovino (ANDRADE & PENA ALFARO, 2007).

Com base no protocolo proposto por Jeyendran et al (1984) para o sêmen humano, vários pesquisadores vêm utilizando o HOST no sêmen de diversas espécies domésticas, tais como nos bovinos (CORREA; ZAVOS, 1994), suínos (VAZQUEZ et al, 1997), equinos (MELO; HENRY, 1999), cães (INAMASSU et al, 1999) e ovinos (OBERST et al, 2003). Andrade & Peña Alfaro (2007), Medeiros & Peña Alfaro (2008), em caprinos, os trabalhos de Batista & Peña Alfaro (2008), ambos trabalhando com a raça Moxotó no semiárido paraibano.

2.3 Soluções hiposmóticas e osmolaridade

O teste hiposmótico foi primeiramente aplicado utilizando-se soluções de açúcares (frutose, melitose e sacarose) e eletrólitos (citrato de sódio e cloreto de sódio), onde a solução composta por 50% de frutose e 50% de citrato de sódio, ambos a 150 mOsmol/Kg H₂O, mostrou-se superior às demais em espermatozoides humanos (JEYENDRAN et al, 1984).

Jeyendran et al (1984), relata que o citrato de sódio e o cloreto de sódio atuam mantendo a integridade funcional dos espermatozoides, sendo o primeiro empregado em estudos visando a padronização do teste hiposmótico.

A frutose e a sacarose são açúcares comumente utilizados em meios diluidores de sêmen, embora a membrana plasmática não permita o transporte da sacarose, devido ao seu peso molecular, o que pode gerar reações diferentes das obtidas com a frutose, açúcar que tem fluxo através da membrana plasmática do espermatozoide, já Neild et al (1999) realizaram estudos nos quais, além desses dois açúcares, foi utilizada também a lactose como componente da solução hiposmótica.

Pinto e Lobo (1997), pesquisando a HOST em sêmen equino in natura e resfriado, usaram como solução hiposmótica o meio de diluente proposto por Kenney et al (1975), com uma osmolaridade de 150 mOsmol/Kg H₂O, observando reação positiva ao teste.

A água destilada foi usada por Dell'Aqua Júnior et al (2002) e Melo et al (2003), como solução na incubação de sêmen equino congelado, sendo observado, pelos últimos, uma superioridade ($P < 0,05$) desta solução em comparação à solução de sacarose a 100 mOsmol/Kg H₂O.

Nos testes hiposmóticos em caprinos, o uso de soluções contendo frutose com citrato de sódio, é mais frequente que o uso de soluções compostas usando somente citrato de sódio (FONSECA et al, 2001; SANTOS et al, 2001; BITTENCOURT et al, 2005; FONSECA et al, 2005);

Os meios/diluentes utilizados na conservação da célula espermática, possuem uma osmolaridade em torno de 300 mOsmol/Kg H₂O (JEYENDRAN et al, 1984); essa mesma osmolaridade, foi classificada por RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T (1994), Vazquez et al (1997) e Melo (1999) como isosmótica em relação ao espermatozoide, canino, suíno e equino, respectivamente.

Lagares et al (1998) mensuraram a osmolaridade do plasma seminal equino e obtiveram média de 284,8 mOsmol/Kg H₂O, essa média pode ser estendida ao sêmen dos demais mamíferos domésticos, pois segundo Garner e Hafez (2003), a composição química, inorgânica e bioquímica dos espermatozoides é basicamente a mesma, diferindo quantitativamente em relação aos constituintes do plasma seminal de cada espécie.

Soluções com osmolaridade acima de 250 mOsmol/Kg H₂O, tendem a promover menores percentuais de reação hiposmótica nos espermatozoides, pois aproximam-se da osmolaridade do plasma seminal. Esse comportamento foi observado por Melo e Henry (1999),

onde os espermatozoides submetidos ao HOST em soluções de 250 e 300 mOsmol/Kg H₂O, apresentaram média de reação abaixo de 7% e 5%, respectivamente.

Comportamento este, também observado, embora com médias um pouco mais altas, por Nie e Wenzel (2001) e por Fonseca et al (2005), no sêmen equino e caprino, respectivamente. Assim sendo, espera-se um maior percentual de reação hiposmótica dos espermatozoides, quando incubados em soluções cuja osmolaridade varie de 0 a 200 mOsmol/Kg H₂O.

Experimentos conduzidos por diversos pesquisadores vêm demonstrando que o intervalo de 100 a 150 mOsmol/Kg H₂O tem permitido, aos espermatozoides, um percentual maior de reatividade hiposmótica. Correa e Zavos (1994) relataram que os espermatozoides bovinos apresentaram 48% de reação hiposmótica ($P < 0,05$) quando submetidos à osmolaridade de 100 mOsmol/Kg H₂O. Fonseca et al (2005) não observaram diferença significativa entre as osmolaridades de 100, 125 e 150 mOsmol/Kg H₂O, sendo que a segunda, demonstrou um leve aumento numérico na porcentagem de reação. Oberst et al (2003), também não encontraram diferença significativa entre 100 e 150 mOsmol/Kg H₂O trabalhando com o sêmen ovino. Andrade & Peña Alfaro (2007), analisando sêmen de carneiros usaram soluções de citrato de sódio e frutose contendo 150 mOsmol/Kg H₂O.

Lin et al (1998) relacionaram a fertilidade e subfertilidade de homens com a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozoide, através do HOST, obtendo correlação positiva ($P < 0,05$), tanto do sêmen *in natura* como congelado, usando como meio hiposmótico a água destilada (0mOsmol/Kg).

A água destilada tem demonstrado uma variação na resposta hiposmótica dos espermatozoides, quando nela incubados. Melo et al (2003) observaram a semelhança entre os percentuais de reação hiposmótica do espermatozoide equino, quando incubados em água destilada ou em solução de cloreto de sódio a 100 mOsmol/Kg H₂O, e a superioridade da água destilada quando comparada à solução de sacarose na mesma osmolaridade.

Comparando soluções de citrato de sódio e de frutose, ambas a 100 mOsmol/Kg H₂O, com água destilada, Alves et al (2005), não observaram diferenças entre o uso de água destilada e as duas soluções, quando fixadas com formol-salina tamponada, entretanto, no ensaio que não ocorreu essa fixação à água destilada, mostrou-se superior ($P < 0,05$), isto demonstrou que, no uso da água destilada o HOST pode sofrer uma interferência quando fixados com formol-salina tamponada, embora os autores sugiram a realização de mais estudos para elucidar estas respostas.

2.3.1 Tempo de incubação e fixação com formol-salina tamponada

O tempo necessário para a incubação do sêmen, visando a realização do teste hiposmótico ainda não está totalmente definido, assim, Cortés et al (1993) indicaram que a maior proporção de reação hiposmótica ocorre nos primeiros vinte minutos do HOST.

Diversos experimentos têm utilizado tempos variados na realização do teste hiposmótico, 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), Bittencourt et al (2005) e Andrade & Peña Alfaro (2007) usaram 30 minutos a 37°C.

Ferreira et al (2001), compararam os percentuais de reações hiposmóticas encontradas, com o sêmen caprino, após os 5 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. Ressaltando que diversas soluções foram utilizadas nessas experimentações. Nie e Wenzel (2001) utilizando sêmen equino *in natura*, não observaram diferença significativa entre tempos de incubação variando de 15 a 180 minutos, embora houvesse uma tendência numérica a favor dos 60 minutos.

Outros trabalhos semelhantes, com sêmen congelado equino, indicaram que 15 minutos de incubação a 37°C, são suficientes, pois ao final deste tempo, a maior parte dos espermatozoides com membrana funcionalmente íntegra já reagiu à condição hiposmótica (MELO et al., 2003; ALVES et al., 2005).

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso do teste hiposmótico no exame dos espermatozoides tem se demonstrado como importante ferramenta no exame da integridade dessas células, uma vez que possibilita a avaliação do grau de comprometimento da membrana espermática. Seu uso torna-se muito adequado tanto pelo baixo custo, como pela facilidade da realização e interpretação da técnica, e confiabilidade dos resultados.

Dadas as características do referido teste, recomenda-se sua inclusão como técnica de rotina na avaliação do sêmen submetido a manipulação e criopreservação, uma vez que essas técnicas provocam um elevado número de injúrias na membrana plasmática dos espermatozoides pela ação do choque térmico nos processos de congelamento e descongelamento do sêmen.

4 REFERÊNCIAS

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, 2005.

ANDRADE, A.K.G.; PEÑA-ALFARO, C.E. **Uso do teste hiposmótico na avaliação de sêmen ovino refrigerado com diluentes à base de tris-gema e leite desnatado**, p. 2-7, Congresso de Iniciação Científica Pibic, Campina Grande UFCG/CNPq, 2007.

BATISTA, L.B; ALFARO, C.E.P. **Avaliação de sêmen caprino diluído em água de coco em pó e mantido sob refrigeração**. 2008. 34 f. Monografia - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde de Tecnologia Rural, Campus de Patos – Pb, Patos Pb, 2008.

BITTENCOURT, R.F.; RIBEIRO FILHO, A.L.; SANTOS, A.D.F.; CHALHOUB, M.; ALVES, S.G.G.; VASCONCELOS, M.F.; LEANDRO, E.E.S.; GUIMARÃES, J.D. Utilização do teste hiposmótico para avaliar a eficácia de diferentes protocolos de criopreservação do sêmen caprino. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.3, p. 213-218, 2005.

BRINSKO, S.P. Fisiologia reprodutiva do macho. In: CUNNINGHAM, J.G. (Ed). **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 2.ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., p. 399-405, 1999.

BRITO, L.F.C.; BARTH, A.D.; BILODEAU-GOESEELS, S.; PANICH, P.L.; KASTELIC, J.P. Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate. **Theriogenology**, v.60, n.8, p. 1539-1551, 2003.

CORTÉS, S.; NÚÑEZ, R. VAZQUEZ, I. Capacidad de reacción a endosmosis de los espermatozoides de macho cabrío. In. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 5., 1993, Portugal. **Anais...** Portugal, v.2, p. 225-229, 1993.

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**, v.42, p. 351-360, 1994.

DELL'AQUA JÚNIOR., 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 eqüino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p. 189-191, 2002.

DREVIUS, L.O.; ERIKSSON, H. Osmotic swelling of mammalian spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v.42, n.1, p. 136-156, 1966.

FERREIRA, G.M.B.C.; SOUSA, J.P.F.; BARBAS, J.P.; HORTA, A.E.M. Teste de endosmose (HOST) em sêmen de caprinos da raça Serrana. In. CONGRESSO IBÉRICO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 3., 2001. **Proceedings...**, p. 559-564, 2001.

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.; 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. **Animal Reproduction**, v.2, n.2, p. 139-144, 2005.

GARNER, D.L.; HAFEZ, E.S.E. Espermatozóide e plasma seminal. In: HAFEZ, E.S.E. & HAFEZ, B., (Ed). **Reprodução Animal**. 7.ed. São Paulo: Editora Manole Ltda, p. 97-110, 2003.

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.

INAMASSU, A.; UECHI, E.; LOPES, M.D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.23, n.3, p. 302-303, 1999.

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.

JASKO, D.J. Evaluation of stallion semen. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.8, n.1, p. 129-148, 1992.

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. **Journal of Reproduction & Fertility**, v.70, p. 219-228, 1984.

KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L.; MORSE, G.W. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: ANNUAL CONVENTION AMERICAN ASSOCIATION EQUINE PRACTITIONERS, 21, 1975, Boston. **Proceedings...**, p. 327, 1975.

LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H.; KLUNG, E. Preservação do sêmen fresco equino: avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da UFRGS**, v.26, n.1, p. 29-42, 1998.

LIN, M.H.; MORSHEID, M.; SRISOMBUT, C.; NASSAR, A.; OEHNINGER, S. Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: an investigation of the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-y staining. **Fertility and Sterility**, v.70, n.6, p. 1148-1155, 1998.

MEDEIROS, B.F.; PEÑA ALFARO, C.E. **Avaliação de sêmen ovino refrigerado diluído em água de coco em pó**,(Monografia) p.12-16, 2008.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.51, n.1, p. 71-78, 1999.

MELO, M.I.V. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – **Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte**, 67 f. 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. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p. 379-380, 2003.

MIES FILHO, A. Fisiologia do aparelho genital masculino. In: _____. (Ed). **Reprodução dos Animais**, v.1, 6.ed. Porto Alegre: Editora Salina, p. 98-132, 1987.

MORAES, Paula Louredo. "Espermatozóide"; **Brasil Escola**. Disponível em <<http://brasilecola.uol.com.br/biologia/espermatozoide.htm>>. Acesso em 26 de julho de 2016.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGUERRO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v.51, p. 721-727, 1999.

NEILD, D.M.; CHAVES, M.G.; FLORES, M. et al. The HOS test and its relationship to fertility in the stallion. **Andrology**, v.32, p. 351-355, 2000.

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.

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. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p. 375-376, 2003.

PEÑA-ALFARO, C.E. **Apontamentos durante orientação do trabalho de conclusão de curso**, UAMV- UFCG, Patos - PB, 2016.

PINTO, N.F.; LOBO, R.N.B. Utilização do teste hipo-osmótico para determinação da integridade da membrana plasmática do sêmen equino a fresco e resfriado por diferentes períodos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.21, n.3, p. 133-135, 1997.

RODRÍGUEZ-GIL, J.E.; MONTSERRAT, A.; RIGAU, T. Effects of hypoosmotic incubation on acrosome and tail structure on canine spermatozoa. **Theriogenology**, v.42, p. 815-829, 1994.

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, p. 438-439, 2001.

SNOECK, Paola Pereira das Neves et al. Qual é o teste hiposmótico mais indicado para avaliar a integridade funcional de espermatozoides equino criopreservados?. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, p.355-361, out-dez 2014.

VAZQUEZ, J.M.; MARTINEZ, E.A.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROCA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v.47, p. 913-922, 1997.