

Utilização do choque osmótico na avaliação da viabilidade de sêmen criopreservado de ovinos

Utilization of the osmotic shock to assess the frozen ram semen viability

Gabriel Felipe Oliveira de MENEZES¹; Rodrigo Freitas BITTENCOURT²;
Antônio de Lisboa RIBEIRO FILHO²; Marcus CHALHOUB²; Marta Freitas BITTENCOURT³;
Eunice OBA⁴; Sony Dimas BICUDO⁴

¹ Universidade Federal de Sergipe (UFS), Aracaju – SE, Brasil

² Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador – BA, Brasil

³ Faculdade de Ciências Agrárias e da Saúde (UNIME), Lauro de Freitas – BA, Brasil

⁴ Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu – SP, Brasil

Resumo

O presente trabalho analisou o emprego do choque osmótico (HOST) com o uso da água deionizada (0 mOsmol), como método de avaliação do sêmen ovino descongelado e correlacionou os resultados obtidos com aqueles encontrados em diferentes técnicas de avaliação de sêmen. Para tanto, vinte amostras de sêmen criopreservado (20 reprodutores), foram avaliadas quanto aos parâmetros de cinética espermática pelo sistema computadorizado (IVOS 12, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, EUA) e análise subjetiva. A análise da viabilidade das membranas espermáticas foi efetuada com a associação de sondas fluorescentes (PI, JC-1 e FITC-PSA). A integridade estrutural da membrana plasmática foi estudada com o teste supravital com eosina (EOS) e, por fim, a integridade funcional da membrana foi avaliada pelo choque osmótico, com a utilização da água deionizada nas seguintes proporções: uma parte de sêmen para 10 (HOST 10), 50 (HOST 50) e para 100 (HOST 100) partes de água. Após a diluição do sêmen, nas diferentes proporções, as amostras foram analisadas quanto ao percentual de espermatozoides reativos ao HOST. Os valores de positividade obtidos para o HOST 10 (33,1%), HOST 50 (32,8%) e HOST 100 (31,8%) não diferiram significativamente. O HOST 10 apresentou importante correlação positiva com a integridade da membrana plasmática pela EOS ($r = 0,8$; $p < 0,05$). Os HOST 50 e 100 demonstraram correlações positivas com subpopulações espermáticas com membrana plasmática íntegra pela fluorescência ($r = 0,83$ e $r = 0,85$; $p < 0,01$). Os resultados obtidos revelaram que o HOST com água deionizada pode fornecer informações complementares para a avaliação da viabilidade do sêmen ovino pós-descongelamento.

Palavras-chave: Ovino. Sêmen criopreservado. Choque osmótico. Água deionizada.

Abstract

This study evaluated the use of hypoosmotic swelling test (HOST) with deionized water (0 mOsmol), as a method of post thaw ram semen evaluation and correlate their findings with different techniques of semen evaluation. Therefore, twenty semen samples of 20 different adult rams were assessed as for kinetic sperm parameters through computerized system (IVOS 12, Hamilton Thorn Biosciences, Beverly, MA, EUA) and subjective analysis. The sperm membranes viability was carried out by the association of fluorescent probes (propidium iodide, JC-1 and FITC-PSA). The structural integrity of the plasma membrane was also studied through supravital test with eosin and the functional integrity of membrane evaluated by doing the hypoosmotic swelling test with deionized water (0 mOsmol), in the following proportions: One part of semen for 10 (HOST 10), 50 (HOST 50) and 100 (HOST 100) parts of water. After semen dilution in the different proportions it was fixed in formalin-buffered saline and analyzed with regard to percentage of HOST reactive sperm (bent/coiled). The percentage of reaction obtained for HOST 10 (33,1%); HOST 50 (32,8%) and HOST 100 (31,8%) did not differ significantly. HOST 10 presented positive correlation with the plasma membrane integrity by the EOS ($r = 0,80$; $p < 0,05$). Positive correlations between HOST 50 and HOST 100 with sperm subpopulation with membrane integrity by fluorescence were observed ($r = 0,83$ and $r = 0,85$; $p < 0,01$). The findings suggest that the HOST with deionized water can provide additional information for post thawing ram sperm viability evaluation.

Keywords: Ovine. Frozen semen. Hypoosmotic swelling test. Deionized water.

Introdução

As características espermáticas normalmente utilizadas (concentração, motilidade e morfologia) são frequentemente insuficientes, por si só, para o diagnóstico de fertilidade/infertilidade do macho, a não ser que individualmente sejam muito diferentes dos valores da normalidade para a espécie (MELO; HENRY; BECKER, 2005).

O choque osmótico (HOST), elaborado na tentativa de avaliar a integridade funcional da membrana plasmática intacta, baseia-se na observação do comportamento do espermatozoide frente a um meio hiposmótico (JEYENDRAN et al., 1984; SALGUEIRO et al., 2003), o que complementaria as diferentes técnicas existentes que avaliam apenas a integridade estrutural da membrana plasmática (OBERST et al., 2003).

Quando os espermatozoides são expostos a condições hiposmóticas, na tentativa de alcançar o equilíbrio osmótico, há um grande influxo da água para o interior da célula, que leva a um aumento importante da pressão hidrostática (JEYENDRAN et al., 1984). Essas mudanças intracelulares tendem a promover um dobramento de cauda indicador de que a membrana plasmática estava com a funcionalidade íntegra (DELLAQUA JR. et al., 2002).

O HOST tem sido utilizado em diferentes osmolaridades como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas espécies (BITTENCOURT et al., 2005; HERNÁNDEZ et al., 2012; PADILHA et al., 2012; VASQUEZ et al., 2013). A utilização da água destilada para o HOST foi eficiente na avaliação do sêmen equino (DELLAQUA JR. et al., 2002). Possivelmente, por apresentar menor osmolaridade (0 mOsmol/L), a água promove a melhor eficiência do teste, quando comparada com soluções com osmolaridades superiores (SANTOS et al., 2013) e também apresenta maior praticidade e menor custo, pois elimina a necessidade de confecção das soluções hiposmóticas.

A osmolaridade da água deionizada é próxima a 0 mOsmol/L, DellaQua Jr. et al. (2002) sugeriram

Correspondência para:

Gabriel Felipe Oliveira de Menezes
Avenida Cardeal da Silva, 58 – Federação
CEP 40231-250, Salvador, Bahia
E-mail: gmenezes.vet@gmail.com

Recebido: 17/06/2013

Aprovado: 24/10/2013

que ela poderia ser utilizada para proporcionar um ambiente hiposmótico adequado para avaliação da integridade funcional da membrana plasmática de espermatozoides de equinos. Os índices de reatividade dos espermatozoides de equinos obtidos justificaram a incorporação do HOST com a água destilada como o protocolo-padrão para a avaliação do sêmen descongelado desta espécie animal.

Alves et al. (2005) compararam a eficácia da água destilada com soluções hiposmóticas (100 mOsmol/L) a base de frutose e citrato, em diferentes tempos de incubação pós-descongelamento (15 e 30 minutos), além da leitura imediata do HOST com água e não observaram diferença entre os percentuais de reatividade ao teste, nas diferentes soluções estudadas e nos diferentes tempos de incubação, embora a média acumulada do HOST com água tenha sido discretamente superior ($p < 0,05$). Ainda concluíram que o HOST com água, diferente das outras soluções hiposmóticas, pode ser analisado imediatamente.

Como na literatura científica consultada não foi encontrado relato da utilização da água destilada-deionizada para avaliação da célula espermática ovina, este foi um dos objetivos deste estudo.

Uma segunda meta do trabalho foi a avaliação de diferentes proporções de diluição sêmen criopreservado/água deionizada, pois quando se trabalha com sêmen criopreservado os espermatozoides estão diluídos em meios diluidores contendo crioprotetores internos, que podem determinar osmolaridades superiores a 1000 mOsmol/L (SNOECK; HENRY; MELO, 2007). Se o sêmen congelado é adicionado a meios hiposmóticos eles ainda terão suas osmolaridades elevadas e isto pode comprometer o resultado do teste.

O terceiro objetivo foi a análise da correlação entre os achados do HOST, nas diferentes proporções, com os resultados obtidos em diferentes técnicas de avaliação espermática.

Matérial e métodos

Foram utilizados 20 reprodutores ovinos adultos das raças Dorper e Santa Inês, que entraram no experimento após aprovação no exame clínico e andrológico (HENRY; NEVES, 1998) e que apresentaram ejaculados *in natura* com mínimo de 70% de espermatozoides com motilidade progressiva. Por reprodutor foi utilizado um *pool* de duas amostras de sêmen pós-descongelção.

O experimento recebeu aprovação do Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP-Botucatu).

Congelção do sêmen

Logo após a colheita do sêmen e avaliações iniciais, o diluidor de congelção foi acrescentado, compondo doses inseminantes com 100×10^6 espermatozoides com motilidade/0,25 mL. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao resfriamento a 5°C (0,47°C/min) e tempo de equilíbrio (tempo total de 2 h) e, então, congeladas em vapor de nitrogênio líquido. A solução de Tris-gema de ovo-glicerol (351 mOsmol/L, sem o glicerol) (BITTENCOURT et al., 2008) foi o diluidor utilizado para a criopreservação espermática.

Avaliação espermática pós-descongelção

As amostras foram descongeladas e analisadas quanto à motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e ao vigor espermático (VIG), em microscopia óptica (HENRY; NEVES, 1998).

A análise da cinética computadorizada (IVOS 12, Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, EUA) foi empregada para a avaliação das motilidades espermáticas total (MTH) e progressiva (MPH), percentual de espermatozoides rápidos (RAP), velocidade progres-

siva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), velocidade de trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral de cabeça (ALH, μm), frequência de batimento flagelar (BCF, Hz), linearidade (LIN, %) e retilinearidade (STR, %). Para tanto, uma alíquota de 5 μL (2×10^6 espermatozoides) da amostra foi diluída em 120 μL de meio X-CELL (IMV, L'Aigle, France) ($16,6 \times 10^6$ espermatozoides/mL), previamente aquecido a 37°C, e mantida nesta temperatura por cinco a dez minutos. Em seguida, 10 μL dessa mistura foram transferidos para câmaras de Makler (Sefi-Medical Instruments, Haifa, Israel) e levados para avaliação da cinética espermática no IVOS 12. Essa análise foi efetuada com a contagem mínima de quatro campos diferentes e mínimo de 300 células.

Foram coletadas alíquotas para realização do teste supravital com corante eosina (EOS) (CEDENHO; TOKUNAGA, 1995) e observação da morfologia espermática, classificando separadamente o percentual de caudas dobradas (CD). Para avaliação em microscopia de fluorescência foi empregada a associação das sondas fluorescentes iodeto de propídio (integridade de membrana plasmática), aglutinina de *Pisum sativum* conjugada à fluoresceína de isotiocianato – FITC-PSA (integridade acrossomal) e JC-1 (potencial da membrana mitocondrial). Foi utilizada a metodologia descrita por Celeghini et al. (2010), com modificações, como segue.

Aos microtubos contendo as amostras de sêmen diluídas no X-CELL foram adicionadas às soluções de trabalho das sondas fluorescentes nas seguintes proporções: 2 μL de IP (25 mg/mL), 2 μL de JC-1 (5 mg/mL). A mistura foi homogeneizada, mantida protegida da luz e incubada a 37°C por 10 a 15 minutos. Em seguida, foram acrescidos 25 μL de FITC-PSA à amostra, que foi novamente homogenizada e 100 espermatozoides foram avaliados sob imersão, em microscopia de epifluorescência.

A classificação das células foi realizada conforme Celeghini et al. (2010), obtendo-se inicialmente oito subpopulações (SBP) espermáticas: **SBP 1** – membra-

na plasmática íntegra, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 2** – membrana plasmática íntegra, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 3** – membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 4** – membrana plasmática íntegra, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 5** – membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 6** – membrana plasmática lesada, acrossomo intacto e baixo potencial de membrana mitocondrial; **SBP 7** – membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e alto potencial de membrana mitocondrial; **SBP 8** – membrana plasmática lesada, acrossomo lesado e baixo potencial de membrana mitocondrial.

Com o objetivo de facilitar o entendimento e a discussão, as subpopulações (SBP) de espermatozoides observadas na fluorescência foram agrupadas em três grupos, de acordo com a estrutura espermática avaliada: Os percentuais de espermatozoides da SBP 1, SBP 2, SBP 3 e SBP 4 obtidos nas diferentes amostras, foram somados e constituíram o grupo com membrana plasmática íntegra (MPI). Os percentuais de SBP 1, SBP 2, SBP 5 e SBP 6 observados nas diferentes amostras, formaram o grupo com membrana acrossomal íntegra (IA) e as SBP 1, SBP 3, SBP 5 e SBP 7 fizeram parte do grupo com alto potencial de membrana mitocondrial (PMM).

Utilização do HOST

O protocolo utilizado para a realização do choque osmótico adotou três diluições distintas: uma parte de sêmen para 10 (HOST 10), 50 (HOST 50) e 100 (HOST 100) partes da solução final, com água deionizada (0 mOsmol). Após a incubação da solução com o sêmen por cinco minutos a 37°C, a mesma foi fixada com 10 µL de solução de formol salino tamponado e observada em microscopia de contraste de fase com aumento de 1000 x e contagem de 100 células.

O percentual de espermatozoides reativos ao HOST foi determinado pela subtração do percentual de es-

permatozoides com cauda dobrada, verificados após o choque osmótico, pelo obtido na morfologia espermática com a eosina logo após a descongelação (BITTENCOURT et al., 2005).

Análise Estatística

O delineamento estatístico empregado foi o inteiramente casualizado, no qual as doses descongeladas por animal foram consideradas as repetições (n = 20) e os protocolos de avaliação do HOST (HOST 10, HOST 50, HOST 100) foram considerados os tratamentos (n = 3). Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o programa estatístico *Statistical Analysis System* (SAS) – versão 5.0 (1996). A sequência de análises empregadas foi:

- 1 - os dados foram previamente submetidos ao estudo da normalidade dos resíduos com o Procedimento *Univariate* (PROC UNIVARIATE, teste Shapiro-Wilk). As variáveis dependentes que não atenderam às premissas estatísticas, quando necessário, foram normalizadas (arco seno);
- 2 - o efeito dos tratamentos foi submetido à análise de variância (ANOVA), com Procedimento *General Linear Model* (PROC GLM). A comparação das médias (transformadas ou não) foi efetuada pelo teste de Student - Newman - Keuls (SNK), com nível de significância de cinco por cento;
- 3 - a relação entre os parâmetros espermáticos foi avaliada pelo teste de correlação linear de *Pearson* (PROC CORR), com nível de significância de cinco por cento.

Resultados e discussão

Cinética espermática pós-descongelação

Os percentuais médios das motilidades subjetivas, total (MT) e progressiva (MP), obtidos para o sêmen *in natura* pós-descongelação foram de 85% e 75%. Após a descongelação, os valores apresentaram redução significativa ($P < 0,05$) para 71% e 60%, respectivamente e, como esperado, o mesmo ocorreu na

avaliação computadorizada (75% e 55%). Apesar da redução, esses percentuais ficaram acima dos observados por Cirit et al. (2013) e Tuncer et al. (2013), e próximos dos encontrados por Maia et al. (2009).

Os valores médios dos parâmetros de cinética espermática computadorizada são apresentados na Tabela 1.

De modo geral, o sêmen pós-descongelamento apresentou parâmetros de cinética espermática de acordo com os valores preconizados por Henry e Neves (1998) para sêmen ovino pós-descongelamento.

Análise de fluorescência, supravital e defeitos de cauda pós-descongelamento

Os resultados verificados na microscopia de fluorescência, no teste supravital com eosina e percentual de espermatozoides com cauda dobrada pós-descongelamento são apresentados na tabela 2.

Assim como verificado com as motilidades espermáticas, também houve redução dos índices de viabilidade espermática pós-descongelamento, pelo teste supravital. Essa ocorrência era esperada e também foi verificada em ovinos por Valente et al. (2010), com quedas significativas ($P < 0,05$) da EOS de 85% no sêmen *in natura*, para 59% e 66%, respectivamente, pós-

descongelamento, de acordo com o meio de congelamento testado. No presente trabalho, a redução no índice de EOS de 24% foi próxima ao valor obtido por Valente et al. (2010), de ± 19 a 26%.

Choque osmótico pós-descongelamento

No sêmen pós-descongelamento, os espermatozoides estão diluídos em meios que, devido à presença de crioprotetores internos, podem chegar a osmolaridades superiores a 1.000 mOsmol/L (SNOECK; HENRY; MELO, 2007). Assim, quando adicionado ao meio hiposmótico para indução do HOST, quanto maior a participação do sêmen descongelado na mistura, maior é a elevação da osmolaridade da solução, o que pode comprometer o resultado do teste.

Contudo, no presente trabalho, divergindo do esperado, os valores de espermatozoides reativos ao HOST (POSIT) nas proporções sêmen/água deionizada testadas não apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$), demonstrando que independentemente da diluição empregada, o comportamento dos espermatozoides não variou (Tabela 3).

De fato, no grupo de HOST com a maior relação sêmen/água deionizada empregada para o teste

Tabela 1 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros de cinética espermática obtidas por análise computadorizada pós-descongelamento em sêmen criopreservado de ovinos

PARÂMETROS DA CINÉTICA ESPERMÁTICA COMPUTADORIZADA (Média \pm S)									
MTH (%)	MPH (%)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	ALH (μm)	BCF (Hz)	STR (%)	LIN (%)	RAP (%)
74,5	55,5	149,0	134,8	204,5	06,1	41,6,7	86,5	65,1	64,2
$\pm 08,9$	$\pm 09,4$	$\pm 11,5$	$\pm 10,8$	$\pm 24,3$	$\pm 00,9$	$\pm 02,2$	$\pm 03,8$	$\pm 07,0$	$\pm 09,7$

■ Motilidade total (MTH), motilidade progressiva (MPH), velocidade progressiva (VSL), velocidade curvilínea (VCL), velocidade de trajeto (VAP), deslocamento lateral de cabeça (ALH), frequência de batimento flagelar (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN) e espermatozoides rápidos (RAP).

Tabela 2 - Médias e desvios-padrão dos parâmetros de integridade espermática na microscopia de fluorescência, viabilidade pelo supravital e caudas dobradas obtidas, pós-descongelamento em sêmen criopreservado de ovinos

MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA, SUPRAVITAL E CAUDAS DOBRADAS (Média \pm S)				
MPI (%)	IA (%)	PMM (%)	EOS (%)	CD (%)
30,6 \pm 17,0	78,1 \pm 17,0	46,5 \pm 32,4	54,7 \pm 12,3	20,7 \pm 11,6

■ Integridade da membrana plasmática (MPI), integridade da membrana acrossomal (IA), alto potencial da membrana mitocondrial (PMM), integridade da membrana plasmática pelo teste supravital (EOS) e cauda dobrada (CD).

Tabela 3 - Médias e desvios-padrão dos percentuais de espermatozoides reativos ao choque osmótico, de acordo com os diferentes grupos (HOST 10, HOST 50 e HOST 100), em sêmen criopreservado de ovinos

Parâmetro (Média ± S)	TRATAMENTO		
	HOST 10	HOST 50	HOST 100
POSIT (%)	33,55 ± 16,22	34,15 ± 13,94	34,35 ± 14,70

Espermatozoides reativos ao choque osmótico = POSIT.

(HOST 10) foi utilizada a proporção de sêmen/meio hiposmótico adequada (1:10), preconizada por Bucak, Ateşşahin e Yüce (2008), Jafaroghli et al. (2011) e Tuncer et al. (2013), o que possibilitou a obtenção de resultados satisfatórios e semelhantes ao verificado nos grupos com menores proporções de sêmen/água (1:50 no HOST 50 e 1:100 no HOST 100).

Como na literatura científica consultada não foram encontrados experimentos empregando água destilada para HOST de ovinos, a discussão que se segue foi baseada em trabalhos com a utilização de soluções hiposmóticas com osmolaridades superiores àquela empregada neste estudo e em trabalhos com a água destilada para o HOST do sêmen de outras espécies.

Oberst et al. (2003) e Jafaroghli et al. (2011) encontraram em ovinos maiores índices de POSIT (soluções de 100 mOsmol) que aqueles obtidos no presente trabalho (63% e 40% versus 34%). Entretanto, os referidos autores não subtraíram do total de caudas dobradas contadas no HOST, o percentual de caudas dobradas observadas no sêmen pós-descongelamento, como realizado no presente trabalho, o que pode ter contribuído para a obtenção dos valores superiores.

Tasdemir et al. (2013), em sêmen bovino (100 mOsmol/L), relataram índices de POSIT variando entre 30 e 40%, próximos aos encontrados neste experimento. O mesmo foi encontrado em ovinos por Soares, Silva e Jacomini (2008) e Padilha et al. (2012), com percentuais de POSIT semelhantes aos encontrados no presente trabalho (32% e 32,7%), embora as soluções hiposmóticas por eles utilizadas tenham sido superiores àquela empregada neste estudo (0 mOsmol versus 125 mOsmol/L).

Embora o presente trabalho não tenha tido o objetivo de comparar soluções com diferentes osmolaridades, os resultados obtidos sugerem que o choque osmótico com a água possa promover índices semelhantes ou superiores de reatividade dos espermatozoides com membrana funcional íntegra, sendo uma alternativa interessante ao choque osmótico com soluções hiposmóticas preparadas (citrato de sódio, associação de frutose e citrato de sódio, sacarose), tanto pela praticidade da disponibilidade de água deionizada, como pela rapidez para a leitura da amostra após a preparação, pois o exame de soluções hiposmóticas com maiores osmolaridades, demanda tempos de incubação de 30-60 minutos, antes da avaliação (OBERST et al., 2003; SOARES; SILVA; JACOMINI, 2008; PADILHA et al., 2012).

Correlações entre o choque osmótico e demais parâmetros espermáticos

Não foram verificadas correlações significativas entre os resultados do choque osmótico e os parâmetros da cinética espermática subjetiva e computadorizada (Quadro 1), assim como relatado por Oberst et al. (2003) em ovinos. Esses achados podem ser justificados, pois, os espermatozoides moribundos, apesar de ainda estarem vivos e com atividade cinética, podem apresentar membranas incapazes de responder ao HOST (MORRELL, 1991), influenciando negativamente o estudo das correlações. Essa afirmação concorda com achados de Perez-Llano et al. (2001) que, à semelhança do verificado no presente trabalho, observaram índices de 20 a 30% inferiores para o HOST, em relação ao percentual de espermatozoides móveis

e viáveis (EOS). Tais constatações indicam que essa diferença possa ser composta por células que mantinham a cinética e a integridade estrutural da membrana, apesar de não terem capacidade de responder ao HOST.

A ausência de correlações entre o HOST e a IA e PMM já era esperada, pois as técnicas são independentes e complementares, justamente por avaliarem estruturas espermáticas distintas. Watson, Plummer e Allen (1987) constataram que a lesão das membranas da região da cabeça espermática pode ser progressiva, começando pela membrana plasmática e, a depender do nível da injúria, envolve posteriormente o acrossoma. Pode-se afirmar, pelo alto percentual de IAC verificado no presente trabalho (78,1%), que o protocolo de congelamento empregado possibilitou a manutenção de níveis adequados desse parâmetro, prevenindo a progressão das injúrias para essa estrutura e consequentemente, interferindo nas correlações que poderiam surgir entre HOST e IAC.

A explicação para a ausência de correlação entre o HOST e PMM pode ser obtida pela constatação de que a despeito do acrossoma não apresentar lesões, a mitocôndria parece ser lesada enquanto a membrana

plasmática pode permanecer intacta, indicando que esta alteração pode ser mais uma consequência direta do estresse térmico sobre as cristas mitocondriais do que das mudanças do microambiente intracelular causado pela perda da integridade da membrana plasmática (WATSON; PLUMMER; ALLEN, 1987).

Dentre as diluições testadas para o choque osmótico, o HOST 10 foi o único que apresentou correlação positiva e significativa ($r = 0,8$, $p < 0,05$) com a integridade de membrana plasmática pelo EOS (Quadro 1).

Correa e Zavos (1994) constataram que o sêmen bovino pós-descongelamento apresentou resultados similares ao presente trabalho, demonstrando a existência de uma correlação positiva alta e significativa ($r = 0,81$) entre o choque osmótico e o supravital, enquanto Brito et al. (2003), com bovinos, observaram a existência de correlação moderada ($r = 0,55$, $p < 0,01$) entre o HOST (citrato de sódio-frutose a 100 mOsmol) e o supravital com eosina. Esses resultados são esperados, já que a integridade funcional e estrutural da membrana plasmática, avaliadas no presente trabalho pelo HOST e supravital, respectivamente, podem estar intimamente relacionadas (CORREA; ZAVOS, 1994).

Quadro 1 - Coeficientes de correlações de Pearson, observados entre os parâmetros estudados em sêmen criopreservado deionizada

	MPI	IA	PMM	EOS	CD	HOST 10	HOST 50	HOST 100	MT	MP	VIG
MPI	N.S.	-		-	-	-	-	-	-	-	-
IA	N.S.	N.S.		-	-	-	-	-	-	-	-
PMM	N.S.	N.S.	N.S.								
EOS	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	-	-	-	-	-	-
CD	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	-	-	-	-	-
HOST 10	N.S.	N.S.	N.S.	*0,8	N.S.	N.S.	-	-	-	-	-
HOST 50	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	*-0,7	N.S.	N.S.	-	-	-	-
HOST 100	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	** -0,9	N.S.	**0,9	N.S.	-	-	-
MT	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-	-
MP	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	-
VIG	N.S.	N.S.	N.S.	*-0,9	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

Coeficientes de correlação obtidos pelo teste de correlação linear de Pearson. Integridade da membrana plasmática (MPI) e acrossomal (IA) observada pela associação das sondas fluorescentes IP, FITC-PSA e JC-1 (1000x). Teste supravital em lâmina corada com eosina (EOSC), percentual de cauda dobrada (CD), choque hiposmótico com 0,1 mL (HOST 10), choque hiposmótico com 0,5 mL (HOST 50), choque hiposmótico com 1 mL (HOST 100), motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP) e vigor espermático (VIG).

* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$

N.S.: não significante.

O HOST 50 e o HOST 100 não apresentaram correlação significativa com a integridade da membrana plasmática pela EOS e pela fluorescência, quando esta última foi estudada agrupando-se as subpopulações espermáticas com integridade da membrana (MPI = SBP 1 a SBP 4). Entretanto, quando foi efetuada a análise de correlações, confrontando-se os dados do HOST com as SBP individualmente, houve elevada correlação entre o HOST 10 e HOST 50 e a SBP 2 ($r = 0,83$, $p < 0,01$) e SBP 3 ($r = 0,85$, $p < 0,01$), respectivamente, subpopulações espermáticas estas com membrana plasmática íntegra. Esses achados sugerem que as referidas diluições do HOST possivelmente podem ser utilizadas para pré-estimar uma elevada ocorrência de subpopulações espermáticas com membranas plasmáticas íntegras.

Embora tenham sido encontradas correlações positivas entre o HOST e algumas subpopulações de espermatozoides com membrana íntegra, não foram verificadas correlações entre o HOST e a integridade de membrana plasmática geral (MPI). Esses resultados concordam com os obtidos por Oberst et al. (2003) em ovinos, que não houve correlação entre o HOST e a avaliação da membrana por sonda fluorescente.

A ausência de correlação significativa entre o HOST e o teste de integridade da membrana plasmática pela fluorescência (MPI) pode ser explicada pelo fato de que a atividade funcional, em algumas situações, pode não estar diretamente associada à integridade da membrana, já que a despeito de estar íntegra pode não ser funcional, ou poderá apresentar lesões

superficiais com a sua funcionalidade inalterada. Essa hipótese foi sugerida por Vazquez et al. (1997), ao afirmarem que espermatozoides vivos podem ter uma membrana não funcional, incapaz de responder ao HOST, mas estruturalmente intacta. Esses autores sugeriram que o HOST é um teste mais sensível que os testes de integridade estrutural da membrana, pois possibilita excluir do grupo de células funcionais, aquelas subviáveis ou moribundas, com capacidade reduzida de se manterem vivas por muito tempo e que não respondem ao HOST, apesar de se apresentarem como viáveis nas colorações. Tais considerações sugerem que a diferença entre o percentual de células que responderam ao teste de integridade estrutural da membrana plasmática pelo EOS, e o encontrado no HOST, potencialmente, pode ser formada por espermatozoides moribundos.

Conclui-se que o choque osmótico com a água deionizada, nas diferentes diluições testadas, pode fornecer informações complementares interessantes para a avaliação da viabilidade do sêmen ovino pós-descongelamento, inclusive, para se pré-estimar a ocorrência de alto percentual de subpopulações espermáticas com membrana plasmática íntegra, especialmente quando utilizado em associação com outros testes de integridade estrutural da membrana. Entretanto, é importante a realização de estudo futuro para padronização da água destilada para HOST em ovinos, comparando-a com as soluções hiposmóticas convencionais utilizadas rotineiramente e correlacionando as informações com teste de fertilidade in vivo.

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 sêmen equino congelado. **Ciência Animal Brasileira**, v. 6, n. 3, p. 219-225, 2005.
- 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.
- BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. L.; ALVES, S. G. G.; VASCONCELOS, M. F.; BISCARDE, C. E.; LEAL, L. S.; OBA, E. O efeito de um quelante de cálcio, de um detergente e da lecitina de soja sobre a congelabilidade do sêmen caprino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 45, n. 4, p. 305-312, 2008.
- BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; BILODEAU-GOESELS, 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.
- BUCAK, M. N.; ATEŞŞAHİN, A.; YÜCE, A. Effect of antioxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research**, v. 75, n. 2, p. 128-134, 2008.
- CEDENHO, A. P.; TOKUNAGA, I. M. Coloração supravital para espermatozoides: comparação entre as técnicas de eosina e eosina-nigrosina. **Jornal Brasileiro de Urologia**, v. 16, n. 4, p. 234-236, 1995.
- CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; ARRUDA, R. P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrossomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 536-543, 2010.
- CIRIT, U.; BAĞIŞ, H.; DEMİR, K.; AGCA, C.; PABUCCUOĞLU, S.; VARIŞLI, Ö.; CLIFFORD-RATHERT, C.; AGCA, Y. Comparison of cryoprotective effects of iodixanol, trehalose and cysteamine on ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 139, n. 1-4, p. 38-44, 2013.
- 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, n. 2, p. 351-360, 1994.
- DELLAQUA 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.
- HENRY, M.; NEVES, J. P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.
- HERNÁNDEZ, M. M. R.; PATINO, H. O.; GREGORY, R. M.; ANGEL, J. C.; RE, D. Del.; JOBIM, M. I. M.; MATTOS, R. C. Suplementação de touros com sabões cálcicos de ácidos graxos poli-insaturados e qualidade seminal pré e pós-congelação. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 49, n. 6, p. 471-479, 2012.
- JAFAROGHLI, M.; KHALILI, B.; FARSHAD, A.; ZAMIRI, M. J. The effect of supplementation of cryopreservation diluents with sugars on the post-thawing fertility of ram semen. **Small Ruminant Research**, v. 96, n. 1, p. 58-63, 2011.
- 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 of Reproduction and Fertility**, v. 70, n. 1, p. 219-228, 1984.
- MAIA, M. S.; BICUDO, S. D.; AZEVEDO, H. C.; SICHERLE, C. C.; SOUSA, D. B.; RODELLO, L. Motility and viability of ram sperm cryopreserved in a Tris-egg yolk extender supplemented with anti-oxidants. **Small Ruminant Research**, v. 85, p. 85-90, 2009.
- MELO, M. I. V.; HENRY, M.; BEKERA, R. C. L. Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 6, p. 757-763, 2005.
- MORRELL, J. M. Applications of flow cytometry to artificial insemination: a review. **Veterinary Record**, v. 129, n. 17, p. 375-378, 1991.
- OVERST, 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.
- PADILHA, R. T.; MAGALHÃES-PADILHA, D. M.; CAVALCANTE, M. M.; ALMEIDA, A. P.; HAAG, K. T.; GASTAL, M. O.; NUNES, J. F.; RODRIGUES, A. P. R.; FIGUEIREDO, J. R.; OLIVEIRA, M. A. L. Effect of insulin-like growth factor-I on some quality traits and fertility of cryopreserved ovine semen. **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 907-913, 2012.
- PEREZ-LLANO, B.; LORENZO, J. L.; YENES, P.; TREJO, A.; GARCIA-CASADO, P. Short hypoosmotic swelling test for the prediction of boar sperm fertility. **Theriogenology**, v. 56, n. 3, p. 387-398, 2001.
- SALGUEIRO, C. C. 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, p. 377-378, 2003.
- SANTOS, E. A. A.; SOUSA, P. C.; PEIXOTO, G. C. X.; SIMÃO, B. R.; OLIVEIRA, M. F.; SILVA, A. R. Establishing the hypoosmotic swelling test for sperm analysis in collared peccaries (Pecari tajacu). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 4, p. 1257-1260, 2013.
- SNOECK, P. P. N.; HENRY, M.; MELO, M. I. V. Efeito de diferentes diluidores sobre a viabilidade espermática pós-descongelamento de sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 56-64, 2007.
- SOARES, P.; SILVA, E. V.; JACOMINI, J. O. Efeito de três crioprotetores sobre a membrana de células espermáticas de ovinos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 35., 2008, Gramado. **Anais...** Gramado, 2008. Disponível em: <<http://www.sovergs.com.br/conbravet2008/anais/cd/resumos/R0636-1.pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2010.
- TASDEMİR, U.; BUYUKLEBLEBICI, S.; TUNCER, P. B.; COSKUN, E.; OZGURTAS, T.; AYDIN, F. N.; BUYUKLEBLEBICI, O.; GURCAN, I. S. Effects of various cryoprotectants on bull sperm quality, DNA integrity and oxidative stress parameters. **Cryobiology**, v. 66, n. 1, p. 38-42, 2013.
- TUNCER, P. B.; TAŞDEMİR, U.; BUYUKLEBLEBICI, S.; OZGURTAŞ, T.; COŞKUN, E.; EROL, H.; AYDIN, F. N.; GURCAN, I. S. Effects of different doses of trehalose supplementation in egg yolk extender in frozen-thawed Angora buck semen. **Small Ruminant Research**, v. 113, n. 2-3, p. 383-389, 2013.

VALENTE, S. S.; PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; MARQUES, C. C.; VASQUES, M. I.; SILVA PEREIRA, M. V. C.; HORTA, A. E. M.; BARBAS, J. P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, p. 74-77, 2010.

VASQUEZ, J. H.; NUNEZ, V. H.; FLORENTINI, E. A.; GONZALES, J. M.; CAMARGO, L. A.; VALDIVIA, M. E. Effects of five cryoprotective agents on quality of sheep epididymal spermatozoa during pre-freezing. **Livestock Science**, v. 152, n. 1, p. 94-99, 2013.

VASQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; MARTINEZ, P.; GARCIA-ARTIGA, C.; ROTA, J. Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. **Theriogenology**, v. 47, n. 4, p. 913-922, 1997.

WATSON, P. F.; PLUMMER, J. M.; ALLEN, W. E. Quantitative assesment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 35, p. 651-653, 1987, Supplement.