

UTILIZAÇÃO DO TESTE HIPOSMÓTICO PARA AVALIAR A EFICÁCIA DE DIFERENTES PROTOCOLOS DE CRIOPRESERVAÇÃO DO SÊMEN CAPRINO

RODRIGO FREITAS BITTENCOURT¹, ANTÔNIO DE LISBOA RIBEIRO FILHO¹, ANSELMO DOMINGOS FERREIRA SANTOS², MARCOS CHALHOUB¹, SIDNEY GONÇALVES GONZALEZ ALVES¹, MARTA FREITAS VASCONCELOS¹, EIDER EDOARDO SALDANHA LEANDRO¹ E JOSÉ DOMINGOS GUIMARÃES³

-
1. Escola de Medicina Veterinária. UFBA. Salvador, BA
 2. Departamento de Zootecnia. UFV. Viçosa, MG
 3. Departamento de Medicina Veterinária. UFV. Viçosa, MG
- E-mail: rfbvet@yahoo.com.br

RESUMO

Este estudo teve por objetivo comparar a eficácia de quatro protocolos de congelamento do sêmen caprino (glicerol, glicerol+EDTA; etilenoglicol; etilenoglicol+EDTA), através da utilização do teste hiposmótico (HOST). O sêmen foi colhido de dois machos da raça Alpina, sexualmente maduros, diluído nos diferentes meios, congelado e armazenado em nitrogênio líquido. Após a colheita, 20µL do sêmen fresco foram incubados com 01mL de solução hiposmótica (combinação de citrato de sódio e frutose em água destilada com osmolaridade de 125mOsmol), em ba-

nho-maria a 37°C por 30 minutos. Este procedimento foi repetido após a descongelamento e, em seguida, uma amostra foi colocada sobre lâmina/lâmina e avaliada em contraste de fase com mil vezes de aumento. Um total de 100 células foi contado, e as médias percentuais de espermatozoides com edema ou dobramento de cauda, após o HOST, foram – para o sêmen fresco, glicerol, glicerol+EDTA; etilenoglicol; etilenoglicol+EDTA –, respectivamente, 53,89; 16,90; 10,25; 52,64 e 57,54.

PALAVRAS-CHAVE: Caprinos, criopreservação, sêmen, teste hiposmótico.

SUMMARY

USE OF HIPOOSMOTIC TEST TO EVALUATE THE EFFICACY OF DIFFERENT PROTOCLOLS OF CRYOPRESERVATION OF THE GOAT SEMEN

The objective of this study was to evaluate the sêmen congelability of male goat of the Alpine breed in four different extenders (glycerol, glycerol+EDTA; ethylene-glycol; ethylene-glycol+EDTA), by means of the hipoosmotic test (HOST). Semen was collected from two males of Alpine breed, sexually mature, diluted in the different extenders, frozen and stored into liquid nitrogen. After collection, 20µL of fresh semen was incubated with 01mL of a hipoosmotic solution (sodium citrate e fructose

combination in distilled water with osmolarities of 125mOsmol) in water bath at 37°C for 30 minutes. This procedure was repeated with the thawed semen and, soon after, a sample was placed on slide and covered with a cover glass and evaluate under phase-contrast microscope at 1000 x magnification. A total of 100 spermatozoas were counted and the averages of spermatozoas with the swolled or coiled tails after the HOST were for the fresh semen, glycerol, glycerol+EDTA, ethylene-glycol e etilenoglicol+EDTA, respectively, 53,89%; 16,90%; 10,25%; 52,64% e 57,54%.

KEY WORDS: Goats, cryopreservation, semen, hipoosmotic test.

INTRODUÇÃO

O teste hiposmótico (HOST) foi originalmente elaborado para uso com espermatozóides humanos, com a função de avaliar a atividade bioquímica da membrana espermática intacta (JEYENDRAN et al., 1984).

Esse teste baseia-se na observação de que um espermatozóide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extra e intracelulares (SANTOS et al., 2001). Com o influxo da água para o interior da célula, há um aumento do volume celular (edema), com posterior dobramento da cauda (JEYENDRAN et al., 1984).

O HOST tem sido utilizado como protocolo de avaliação da viabilidade funcional da membrana espermática de diversas espécies: humanos (JEYENDRAN et al., 1984), eqüinos (ALVES et al., 2004; MELO, 1999), caninos (KUMI-DIAKA, 1993), ovinos (OBERST et al., 2003) e caprinos (FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003).

JEYENDRAN et al. (1984), ao descreverem a utilização da técnica para avaliação do espermatozóide humano, testaram soluções com osmolaridades que variaram de 50 a 300 mOsmol, obtendo os melhores índices de reação espermática ao teste ao utilizarem soluções a 150 mOsmol/L, ou menos. Os mesmos autores também testaram diferentes solutos (citrato de sódio, sucrose, melitose, frutose e cloreto de sódio) e associações entre eles, e verificaram que a taxa de reação espermática variava de acordo com a solução usada, dentro da mesma faixa de osmolaridade. Obtiveram os melhores resultados com a utilização da associação entre citrato de sódio (50%) e frutose (50%) a 150 mOsmol/L, incubada por 30 minutos a 37°C, razão por que escolheram esse protocolo como padrão para todos os outros experimentos a serem realizados futuramente.

MELO (1999), em estudo que objetivava a padronização do HOST para a espécie eqüina, observou que, independentemente do soluto utilizado,

maiores taxas de reação ao teste (com a contagem de 100 células por amostra) foram conseguidas utilizando-se soluções com 150 mOsmol/L a 50 mOsmol/L, incubando as amostras por 30 minutos, a 37°C. Nessa faixa de osmolaridade também foram menores as oscilações.

Em caprinos, FONSECA et al. (2001), utilizando uma solução hiposmótica, formulada pela combinação de citrato de sódio (50%) e frutose (50%) em água destilada, testaram osmolaridades que variavam de 50 a 300 mOsmol/L. Os autores observaram que a maior percentagem de espermatozóides reativos ao teste e com um maior grau de reação (dobramento de cauda e edema) foi encontrada em solução hiposmótica a 125 e 150 mOsmol/L. SANTOS et al. (2001) também encontraram bons resultados, trabalhando com essa mesma combinação de solutos, a 60 mOsmol. Esses autores, porém, trabalharam com um tempo de incubação de 60 minutos, a 37°C. Esse tempo é superior ao preconizado por CAIZA DE LA CUEVA et al. (1997), e citam que o tempo ideal para que ocorram as reações é de 20 a 30 minutos.

Estudos têm demonstrado a correlação do HOST com a fertilidade *in vitro* do sêmen de touros (ROTA et al., 2000), de hâmsers (JEYENDRAN et al., 1984) e com a motilidade espermática do sêmen canino descongelado (KUMI-DIAKA, 1993). Esse teste também é importante por acusar alterações intensas da funcionalidade espermática, em amostras que não seriam condenadas somente pelos resultados das avaliações de motilidade e morfologia espermáticas (MELO, 1999).

Assim, apesar de ser um teste relativamente novo para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide, o HOST deve ser considerado como um indicador de fertilidade, já que a viabilidade da membrana é um requisito básico para que ocorra a fertilização (MELO, 1999).

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de diferentes protocolos de congelamento do sêmen caprino por meio da avaliação da integridade funcional da membrana celular dos espermatozóides, através da utilização do teste hiposmótico.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas dez amostras de sêmen colhidas de dois machos caprinos adultos, através de vagina artificial, utilizando como manequim uma fêmea em estro. Após a colheita, a amostra de sêmen foi encaminhada imediatamente para o laboratório de processamento e colocada em banho-maria, à temperatura de 37°C, para realização do exame físico do ejaculado (volume, aspecto, turbilhonamento, vigor e motilidade espermática) e cálculo da concentração espermática (1:400) em câmara de Neubauer.

Para a avaliação de danos na morfologia espermática (alterações de cabeça e cauda), foram retiradas alíquotas de 20 µL do sêmen fresco e colocadas em tubos com 2 mL de formol-salina tamponado (HANCOCK, 1957). Posteriormente, essas alíquotas foram avaliadas, através de preparação úmida entre lâmina e lamínula, por meio de microscopia com contraste de fase em aumento de mil vezes e imersão. Para tanto, foram contadas cem células espermáticas, computando-se e classificando-se individualmente as alterações encontradas. Dentro de dois grupos, classificaram-se defeitos menores e defeitos maiores, segundo BLOM (1973). O mesmo procedimento foi feito com cada um dos quatro tratamentos com sêmen descongelado.

É importante citar que espermatozoides que continham duas patologias associadas, tendo o dobramento de cauda, como uma delas, tiveram as duas patologias computadas, podendo em alguns casos o número de patologias ultrapassar os 100%. Isso devido à necessidade de subtração do número de caudas dobradas patológicas, do número de espermatozoides com dobramento de cauda, como reação ao teste hiposmótico empregado e assim tornar mais eficiente o cálculo de espermatozoide reativos ao HOST, mesmo que com isso fosse aumentado muito o número de patologias registradas para os espermatozoides descongelados.

Aos tubos, contendo uma solução de citrato de sódio-frutose (1mL), foram adicionados 20 µL de sêmen fresco. Em seguida, contendo a solução com o sêmen, os tubos eram incubados por 30 minutos (CAIZA DE LA CUEVA, 1997; MELO, 1999), em banho-maria a 37°C. ALVES et al. (2004)

observaram que, após esse período de incubação, as amostras poderiam ser fixadas com solução de formol-salina tamponada para serem avaliadas futuramente, sem comprometer, com isso, os resultados. Essa foi a metodologia utilizada neste estudo, e as avaliações das amostras foram realizadas posteriormente, através da colocação de alíquotas dessa mistura entre lâmina e lamínula, para contagem de cem células em microscopia de fase com aumento de mil vezes. Alíquotas dos quatro tratamentos também foram submetidas ao teste hiposmótico, conforme o procedimento para o sêmen fresco.

As células foram classificadas quanto à presença ou não de cauda dobrada, segundo descrito por KUMI-DIAKA (1993). O cálculo do número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HO) foi feito por intermédio da fórmula citada por MELO (1999), a saber:

$$HO\% = (\% \text{ de alterações na região da cauda após teste HOST}) - (\% \text{ de alterações na região da cauda antes do teste HOST}).$$

Nesta fórmula de cálculo todas as alterações de cauda, associadas ou não a defeitos de outra região de espermatozoide, foram computadas antes e depois do teste HOST, sendo que possíveis resultados negativos foram considerados iguais a zero (MELO, 1999).

Para a análise estatística das características avaliadas, foi empregado o pacote estatístico Statistical Analysis System (SAS) – versão 6.1 (1996). A consistência dos dados e a análise descritiva (médias e desvio padrão) das características de interesse ao estudo foram realizadas mediante o emprego do PROC MEANS, e as variáveis estudadas foram comparadas por meio do PROC GLM, utilizando-se o teste de Student – Newman – Keuls (SNK).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 encontram-se as médias de motilidade e vigor para o sêmen fresco e para os quatro grupos (glicerol, glicerol+EDTA, etileno, etileno+EDTA), logo após a descongelação.

TABELA 1. Médias de motilidade (%) e vigor (0-5) para os espermatozóides do sêmen fresco, e para os quatro tratamentos (glicerol, glicerol+EDTA, etileno e etileno+EDTA), logo após a descongelção.

Tratamento	Motilidade (%)	Vigor (0-5)
Sêmen fresco	86,00 ± 3,16 a	4,05 ± 0,16 a
Glicerol	51,00 ± 6,14 c	3,15 ± 0,24 b
Glicerol+EDTA	61,00 ± 8,43 b	3,25 ± 0,26 b
Etileno	10,00 ± 12,47 d	1,4 ± 1,22 c
Etileno+EDTA	12,00 ± 13,98 d	2,0 ± 1,13 c

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na coluna diferem entre si ($p < 0,0001$) pelo teste SNK.

As médias de reação ao teste hiposmótico (HOST-125mOsmol), para o sêmen fresco e para os grupos glicerol, glicerol+EDTA, etileno, etileno+EDTA, após descongelção, podem ser observadas na Tabela 2. Os valores encontrados são semelhantes aos descritos por SANTOS et al. (2001) que, ao utilizarem uma solução hiposmótica a 60mOsmol, com tempo de incubação de 60 minutos, obtiveram para o sêmen fresco médias de 48% e 57% para animais jovens e adultos, respectivamente, porém inferiores aos encontrados por FERREIRA et al. (2001) utilizando solução a 100mOsmol, com tempo de incubação de 25 minutos (média de 88%). Também são inferiores às médias (acima de 90%) descritas por SALGUEIRO et al. (2003), com a ressalva de que esses últimos não relataram a osmolaridade da solução usada, nem o tempo de incubação, o que tira o valor prático do estudo realizado.

Através da Tabela 2, também pode-se verificar que não houve diferença estatística entre os grupos etileno, etileno+EDTA e o sêmen fresco, para o número médio de espermatozóides reativos ao teste hiposmótico (HOST), indicando a eficácia do etilenoglicol em preservar a membrana dos espermatozóides caprinos, durante o processo de criopreservação. Essa mesma tabela mostra a ineficácia do glicerol em promover a proteção da membrana espermática, constatada pelo baixo índice de espermatozóides reativos ao HOST, nos grupos glicerol e glicerol+EDTA (16,9% e 10,25%).

Neste trabalho, as médias de reação ao HOST (Tabela 2), para o sêmen criopreservado com glicerol

(glicerol e glicerol+EDTA), foram inferiores às observadas por SANTOS et al. (2001), de 36% e 39%, para caprinos jovens e adultos, respectivamente, e às verificadas por SALGUEIRO et al. (2003), que encontraram como valor máximo de reação 96% e mínimo de 31%. FONSECA et al. (2001), utilizando a mesma solução hiposmótica e com a mesma osmolaridade deste estudo, conseguiram uma média de 62,75% de espermatozóides reativos.

É importante ressaltar que os autores citados (FONSECA et al., 2001; SANTOS et al., 2001; SALGUEIRO et al., 2003) não descontaram dos valores encontrados de reação ao HOST os percentuais de patologias de cauda usualmente encontradas (antes da incubação para o HOST), tanto no sêmen fresco, mas, principalmente, após o processo de criopreservação, que geralmente provoca o surgimento de dobramento de cauda. Assim, erroneamente consideraram todas as alterações de cauda como sendo reativas à incubação em solução hiposmótica. Esse fato pode explicar os valores elevados de reação ao HOST encontrados nesses três estudos citados.

Os valores de reação ao HOST foram superiores nos grupos etileno e etileno+EDTA, embora a motilidade espermática observada tenha sido muito inferior quando comparada aos grupos glicerol e glicerol+EDTA (Tabela 1). Isso pode ser explicado pelo seguinte fato: o etilenoglicol é mais eficaz em preservar a integridade da membrana espermática que o glicerol (SOUZA et al., 2002), mas ele é mais tóxico. Já na concentração de 7%,

que segundo SOUZA et al. (2002) é acima das concentrações recomendadas para criopreservação de sêmen, o etilenoglicol, provavelmente, ocasionou a imobilidade espermática da maioria das células, ainda que tenha promovido, com eficácia, a manutenção da integridade da membrana dos espermatozoides criopreservados (Tabela 2). Vale assinalar que se utilizou o termo imobilidade espermática, uma vez que não foram feitos testes complementares que confirmassem a existência de morte celular.

A superioridade do etilenoglicol, em relação ao glicerol, na capacidade de prevenir lesões da membrana espermática ocasionadas pelo processo de congelamento pode ser observada na Tabela 3, em que se verifica que a diminuição no percentual de espermatozoides reativos ao HOST do sêmen fresco para o congelado foi de 7,24% e 7,9% para os grupos com etilenoglicol, respectivamente (etileno e etileno+EDTA). Para os grupos com glicerol, essa diminuição foi de 30,9% e 43,0%, respectivamente (glicerol e glicerol+EDTA).

TABELA 2. Valores médios (%) e desvios padrões de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST), para o sêmen fresco e para os quatro grupos, após descongelamento (glicerol, glicerol+EDTA, etileno, etileno+EDTA).

	Sêmen fresco	Glicerol	Glicerol+EDTA	Etileno	Etileno+EDTA
HOST	53,9 ± 18,0 a	16,9 ± 6,3 b	10,2 ± 13,3 b	52,6 ± 12,9 a	57,54 ± 9,8 a

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si (P<0,0001) pelo teste SNK.

TABELA 3. Valores médios (%) da diferença, do número de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico (HOST), entre o sêmen fresco (FR) e os quatro grupos após descongelamento (glicerol, glicerol+EDTA, etileno, etileno+EDTA).

	Glicerol	Glicerol+EDTA	Etileno	Etileno+EDTA
THFR - PD	30,90 ± 11,2 ab	43,0 ± 25,2 a	7,24 ± 13,5 b	7,90 ± 7,2 b

Valores seguidos de letras minúsculas distintas na mesma linha diferem entre si (P<0,0080) pelo teste SNK.

PD = pós-descongelamento

CONCLUSÕES

Os grupos que utilizaram o etilenoglicol como crioprotetor (etileno e etileno+EDTA) foram os mais eficazes em promover a manutenção da integridade morfofuncional da membrana dos espermatozoides caprinos criopreservados.

O teste hiposmótico mostrou ser um método eficiente para avaliação da viabilidade da membrana espermática dos caprinos. Porém, é necessário o desenvolvimento de novos estudos para a padronização da técnica, com a confirmação dos melhores solutos e da melhor osmolaridade a serem empregados para essa espécie.

AGRADECIMENTOS

Ao Fundo de Amparo à Pesquisa no Estado da Bahia (Fapesb).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS

ALVES, S.G.G.; SNOECK, P.P.N.; RIBEIRO FILHO, A. de L.; BITTENCOURT, R.F.; PORTELA, A.P.M.; MELO, M.I.V.; HENRY, M. Effects of solution, incubation time and sperm fixation on equine cryopreserved sperm cells submitted to the hypoosmotic swelling test. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 15., Porto Seguro, Brasil. **Abstracts...** Belo Horizonte: CBRA, 2004. p. 508.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. **Nordic Veterinary Medicine**, v. 25, p. 383-391, 1973.

CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; RIGAU, T.; BONET, S. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effect of ouabain. **Theriogenology**, v. 47, p. 765-784, 1997.

HENRY, M.; NEVES, J.P. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2. ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

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

FONSECA, J.F.; TORRES, C.A.A.; ROVAY, H.; BORGES, A.M.; BARBOSA, L.P.; MAFFILI, V.V.; FRAGA, D.B.M. Hypoosmotic swelling test in goat spermatozoa. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, p. 436-457, 2001.

HANCOCH, J. L. The morphology of boar spermatozoa. **Journal of Reproductive Microscopy Society**, n. 76, p. 84-97, 1957.

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

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

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

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 para avaliação da integridade da membrana plasmática do carneiro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 375-376, 2003.

ROTA, A.; PENZO, N.; VINCENTI, L.; MONTOVANI, R. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 53, p. 1415-1420, 2000.

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

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

SAS. **User's guide**: statistics, version 6.1. Cary: SAS Institute Inc., 1996. 956p.

SOUZA, A.F.; GUERRA, M.M.P.; BATISTA, A.M.; MERGULHÃO, F.C.C.; NEVES, A.C.; WISCHRAL, A. Congelamento de sêmen caprino utilizando os crioprotetores glicerol e etilenoglicol. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Supl. 5, p. 103-105, 2002.