

## Teste hiposmótico para avaliação da viabilidade do sêmen equino resfriado com diferentes diluidores

[*Hypoosmotic test to predict viability of equine chilled semen in different extenders*]

M.I.V. Melo, M. Henry, A.R.C.L. Beker

Escola de Veterinária – UFMG  
Caixa Postal 567  
30123-970 - Belo Horizonte, MG

### RESUMO

Utilizou-se o teste hiposmótico (HO) para estudar a capacidade de preservação da membrana plasmática do sêmen equino resfriado em diferentes meios. Estimou-se a correlação entre os resultados do teste HO e os exames de rotina aplicados ao sêmen, usando-se sêmen de sete garanhões. Cada ejaculado foi diluído em três meios, Kenney (K), Baken com 3% de gema (B3) e Baken com 10% de gema de ovo (B10), e resfriado a 5°C. Avaliaram-se a motilidade total (MT), a motilidade progressiva (MP), o vigor espermático (V), a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais (NOR) e os resultados do teste HO no sêmen fresco e a cada 24 horas pós-resfriamento. A longevidade espermática foi considerada como o tempo de manutenção da motilidade espermática progressiva superior a 10% do sêmen diluído e resfriado. Maior longevidade espermática foi obtida nas amostras diluídas em meio B3. Os resultados do teste HO sugerem que os diluidores à base de gema de ovo preservaram melhor a membrana plasmática. Foram obtidos valores de correlação ( $P < 0,05$ ) entre o teste HO e a motilidade espermática ( $MT=0,57$ ;  $MP=0,59$ ), e correlação baixa entre HO e NOR (0,16).

Palavras-chave: equino, teste hiposmótico, sêmen resfriado, diluidor

### ABSTRACT

*The hypoosmotic test (HO) was used to evaluate plasmatic membrane integrity of equine chilled semen and to estimate the correlation between the results of the HO test and those from applied routine exams of semen. The semen of seven stallions was preserved at 5°C in three different extenders. Each ejaculate was diluted in three extenders, Kenney (K), Baken with 3% of egg yolk (B3) and Baken with 10% of egg yolk (B10), and chilled at 5°C. The total motility (MT), progressive motility (MP), spermatic vigor (V), normal spermatic morphology (NOR) and HO test were used to evaluate semen immediately after collection and at 24 hour-intervals. Spermatic longevity was defined as the time taken to the progressive motility to decline under 10%. Semen diluted in B3 had the best longevity. The results of the HO test suggest that extenders made with egg yolk preserved the membrane plasmatic. Correlation ( $P < 0.05$ ) between HO test and spermatic motility ( $MT=0.57$ ;  $MP=0.59$ ), and low correlation between HO and NOR (0.16) were observed.*

*Keywords: equine, hypoosmotic test, chilled semen, extender*

## INTRODUÇÃO

Características espermáticas padrão (concentração, motilidade e morfologia) são frequentemente insuficientes, por si só, para o diagnóstico de fertilidade/infertilidade, a não ser que individualmente sejam muito diferentes dos valores da normalidade para a espécie. A habilidade do teste hiposmótico (HO) em avaliar a integridade funcional da membrana plasmática torna-o um teste complementar importante na avaliação *in vitro* do sêmen criopreservado, uma vez que tanto a congelamento quanto o resfriamento podem levar a efeitos deletérios sobre a membrana.

Meios diluidores de sêmen são utilizados com o objetivo de proteger os espermatozoides contra os efeitos deletérios do resfriamento a temperaturas críticas. Os meios diluidores mais amplamente empregados em procedimentos de resfriamento do sêmen equino são à base de leite desnatado e gema de ovo, oferecendo resultados variados em relação à motilidade espermática, como relatado em revisão de Silva Filho (1994).

Este experimento teve como objetivo utilizar o teste HO para estudar o comportamento do sêmen equino resfriado em diferentes meios, avaliando sua capacidade em preservar a membrana plasmática e identificar o grau de associação entre o teste HO e os exames de rotina aplicados ao sêmen.

## MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se sêmen de sete garanhões, sendo seis da raça Mangalarga Marchador e um da Bretão, todos coletados no mesmo dia. Logo após a coleta, foi feita a avaliação das características físicas do sêmen (motilidade total, motilidade progressiva e vigor) segundo Jasko (1992). Uma alíquota foi fixada em solução de formol-salina para posterior avaliação das características morfológicas (Kenney et al., 1983), em microscopia de contraste de fase, e outra foi submetida ao teste HO. Após esses procedimentos, cada ejaculado foi diluído em três meios: Kenney (K) (Kenney et al., 1975), Baken com 3% de gema (B3) (Nishikawa, 1959) e Baken modificado com 10% de gema de ovo (B10) (Mello, 1998), todos preparados sem antibióticos. As osmolaridades dos meios diluidores K, B3 e B10 foram, respectivamente, 351,5mOsmol/l, 321,5mOsmol/l e 357,5mOsmol/l. Inicialmente procedeu-se à diluição 1:1 em cada um dos meios diluidores (10ml de sêmen em 10ml de cada meio diluidor, ambos a 37°C), até o cálculo da diluição final. A concentração espermática foi ajustada para  $50 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Procurou-se manter o volume da amostra final, a ser submetida ao resfriamento, próximo de 40ml. Durante o processamento, o sêmen diluído 1:1 foi mantido em temperatura ambiente. O tempo gasto entre a coleta e o início do resfriamento é apresentado na Tab. 1.

Tabela 1. Características físicas do sêmen equino imediatamente pós-coleta, diluição final, volume final e tempo entre coleta e início do resfriamento

GAR	1	2	3	4	5	6	7	Média	Desvio
MT (%)	75	80	75	80	75	50	85	74,3	11,3
MP (%)	70	70	60	60	75	50	65	64,3	8,4
V (0-5)	3	4	4	4	4	3	4	3,7	0,5
DF	1:9,8	1:2,3	1:2,9	1:2,6	1:3	1:3	1:3	1:3,8	
VF (mL)	54	33,5	39	36	40	40	40	40,4	6,5
TCR (min.)	92	111	130	173	90	106	88	112,8	30,4

GAR= garanhão; MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; V= vigor espermático; DF= diluição final do sêmen; VF= volume final do sêmen diluído; TCR= tempo entre coleta e início do resfriamento do sêmen.

O resfriamento foi feito em geladeira doméstica, submetendo-se as amostras às seguintes taxas de resfriamento: primeiros 15 minutos, -0,16°C/minuto, e primeiras duas horas, -0,09°C/minuto, até estabilizar a 5°C. Com o intuito de evitar qualquer flutuação na temperatura com o manuseio, as amostras foram

mantidas na geladeira, submersas em água a 5°C, durante o período experimental.

A cada 24 horas, de cada amostra foram retirados 2ml e colocados em banho-maria a 37°C durante três minutos. Procederam-se avaliações das amostras e retirada da alíquota para realização do

teste HO. As avaliações das características físicas e morfológicas do sêmen e o teste HO foram realizados a cada 24 horas pós-resfriamento, até a queda da motilidade progressiva para valores inferiores a 10%. O tempo de aquecimento das amostras foi alterado para cinco minutos a partir do quinto dia de leitura. A longevidade espermática foi considerada como tempo de manutenção da motilidade espermática progressiva igual ou superior a 10% (Jasko, 1992). O teste HO foi realizado conforme Melo e Henry (1999), constando da incubação de 0,1ml de sêmen em 1,0ml de solução de sacarose 100mOsmol, a 37°C/30 minutos. Foram contadas 100 células no aumento de 500 vezes em microscopia de contraste de fase, e o cálculo de formas reativas seguiu a fórmula: HO = (% de alterações na região da cauda após teste HO) - (% de alterações na região da cauda antes do teste HO).

O delineamento experimental, utilizado para o estudo das características físicas e morfológicas do sêmen e os resultados do teste HO, foi o de parcelas subdivididas, sendo o dia de resfriamento considerado a subparcela. A variável HO, que apresentou valores percentuais com grande variação, foi transformada para ângulo, correspondendo arco-seno  $\sqrt{X/100}$ . Para comparação entre médias, usou-se o teste t de Student (User's..., 1990).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As características do sêmen e os detalhes dos procedimentos na manipulação do sêmen estão resumidos na Tab. 1. A porcentagem média de espermatozoides morfolologicamente normais foi  $60,3 \pm 9,2\%$ . Os ejaculados utilizados para o resfriamento seguiram o padrão de normalidade para a espécie sugerido por Jasko (1992).

A diluição final foi superior a 1:2, conforme recomendado na literatura (Jasko et al., 1991; Loomis, 1992). A taxa de resfriamento citada na metodologia refere-se ao resfriamento a partir da temperatura ambiente (próximo de 25°C) e

condiz com as sugestões de Kayser et al. (1992), os quais afirmaram que o espermatozoide equino deve ser resfriado a taxas  $\leq -0,1^\circ\text{C}/\text{minuto}$ , preferencialmente a  $-0,05^\circ\text{C}/\text{minuto}$ , de 20 a 5°C.

Optou-se por analisar os resultados até o sexto dia pós-resfriamento, baseando-se na observação de que a maioria dos ejaculados manteve, em todos os meios diluidores até esse dia, motilidade progressiva acima de 10%.

Para avaliar a capacidade de preservação dos meios diluidores, compararam-se motilidade total, motilidade progressiva, vigor e porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais no primeiro dia de armazenamento a 5°C, no quarto e no sexto dia. Escolheu-se o quarto dia como o intermediário, dentro desse período de armazenamento, para comparação entre os meios diluidores, pois ele foi considerado um dia crítico com base, principalmente, nas avaliações da motilidade total. Os três meios preservaram bem a motilidade espermática até o terceiro dia de resfriamento. Na análise comparativa dos dias de resfriamento, dentro de cada meio, observou-se que nos três primeiros dias de resfriamento a queda da motilidade total e progressiva foi lenta. No meio B10, a queda do vigor espermático ao longo dos dias de armazenamento foi mais evidente. No meio K, a queda do vigor foi bem lenta e gradativa, e no meio B3, não houve alteração do vigor espermático ao longo dos dias de armazenamento (Tab. 2).

Não houve alteração significativa da porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, ao longo dos dias de armazenamento, no sêmen resfriado. As oscilações encontradas foram decorrentes de diferenças já esperadas entre leituras, aproximadamente 5%. No meio K, a variação entre a porcentagem de espermatozoides morfolologicamente normais, ao longo dos dias de armazenamento, foi 4,8%; no meio B3, a diferença entre as leituras foi 4,2%; e no meio diluidor B10, a diferença não ultrapassou 4,0%.

Tabela 2. Características físicas e morfológicas do sêmen de sete garanhões, diluído em meio Baken com 10% de gema de ovo (B10), Baken com 3% de gema de ovo (B3) e Kenney (K), e resfriados a 5°C

Diluidor	Dia	MT (%)	MP (%)	V (0-5)	NOR
B10	1	64,6 ± 6,9aA	58,6 ± 7,2aA	3,1 ± 0,3aAB	67,0 ± 15,6aA
	2	57,9 ± 11,0ab	54,3 ± 9,2a	3,1 ± 0,7a	69,0 ± 13,1a
	3	53,6 ± 17,1bc	50,4 ± 15,4ab	2,4 ± 0,7b	67,8 ± 8,6a
	4	43,6 ± 16,4cE	40,2 ± 15,7bD	2,1 ± 0,9bE	73,8 ± 11,1aD
	5	20,1 ± 17,6d	16,9 ± 13,9c	2,3 ± 0,8b	67,1 ± 4,8a
	6	12,2 ± 16,3eH	10,9 ± 15,1dH	1,7 ± 0,9cI	71,8 ± 9,4aG
B3	1	66,1 ± 8,1aA	57,5 ± 6,1aA	3,0 ± 0,5aB	63,0 ± 13,9aAB
	2	64,3 ± 11,0ab	57,9 ± 10,6a	3,1 ± 0,6a	66,2 ± 9,6a
	3	65,4 ± 7,0ab	56,8 ± 7,9a	3,1 ± 0,2a	63,4 ± 11,6a
	4	54,6 ± 14,9bcD	47,5 ± 14,1abD	3,0 ± 0,3aD	67,7 ± 12,3aDE
	5	45,0 ± 11,6c	38,2 ± 10,8b	2,9 ± 0,4a	69,8 ± 11,1a
	6	29,3 ± 13,5dG	26,4 ± 12,0cG	2,7 ± 0,6aG	68,7 ± 9,9aGH
K	1	64,0 ± 13,9A	48,9 ± 21,8abA	3,5 ± 0,4aA	59,5 ± 8,4aB
	2	61,4 ± 11,7a	56,1 ± 9,9a	3,4 ± 0,6a	60,8 ± 14,8a
	3	53,9 ± 10,1ab	43,6 ± 8,4b	2,8 ± 0,6b	59,7 ± 14,0a
	4	48,9 ± 18,8bDE	39,3 ± 15,0bD	3,1 ± 0,7abD	66,4 ± 17,3aE
	5	30,5 ± 14,6c	25,5 ± 11,9c	2,7 ± 0,9b	65,2 ± 8,8a
	6	17,3 ± 9,7dGH	13,0 ± 7,8dH	2,1 ± 0,6cH	64,4 ± 11,9aH

Letras minúsculas distintas na coluna indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ) dentro de cada meio diluidor.

Dia 1 = letras maiúsculas distintas na coluna indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ) entre diluidores; dia 4 = letras maiúsculas distintas na coluna indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ) entre diluidores; dia 6 = letras maiúsculas distintas na coluna indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ ) entre diluidores.

MT = motilidade total; MP = motilidade progressiva; V = vigor espermático; NOR = espermatozoides morfológicamente normais.

Na análise de variância do teste HO (porcentagem de formas reativas), garanhão, meio diluidor, período de armazenamento e interação entre garanhão e meio diluidor tiveram efeito significativo. A interação meio diluidor *versus* dia de resfriamento não foi significativa. Observa-se que a variação individual foi significativa, devendo ser considerada na análise dos resultados. O coeficiente de determinação foi alto ( $R^2 = 0,87$ ), mostrando adequação do modelo em relação ao aspecto estudado, permitindo estimativas confiáveis, e o coeficiente de variação baixo, 25,3%, indicando instabilidade da resposta ao teste HO.

Houve queda gradativa na porcentagem de formas reativas ao teste HO à medida que aumentou o período de armazenamento nos três meios estudados (Tab. 3). Os meios B3 e B10 tiveram comportamento semelhante nos dias um, quatro e seis de resfriamento, apresentando sempre resultados superiores ao meio K, quanto à porcentagem de formas reativas ao teste HO. O ligeiro acréscimo, não significativo, observado na porcentagem média de formas reativas ao teste HO no armazenamento no meio B10 do quinto para o sexto dia, provavelmente, deveu-se

à retirada de um dos animais, que na análise do quinto dia já apresentava motilidade total e progressiva inferior a 10%. Esse animal apresentou as porcentagens mais baixas no teste HO nas leituras anteriores (quarto e quinto dias).

Tabela 3. Percentual de espermatozoides eqüinos reativos ao teste hiposmótico (HO) do sêmen de sete garanhões, diluído em meio Baken com 10% de gema de ovo (B10), Baken com 3% de gema de ovo (B3) e Kenney (K), e resfriado a 5°C

Dia	B10	B3	K
1	40,8 ± 19,6abA	46,5 ± 16,1aA	26,2 ± 10,7aB
2	42,2 ± 19,3a	46,8 ± 10,8a	22,5 ± 8,5ab
3	35,5 ± 19,4ab	42,4 ± 8,8ab	20,5 ± 6,6ab
4	29,3 ± 21,8bcA	38,8 ± 12,5abA	14,8 ± 7,9bcB
5	20,7 ± 11,9c	32,8 ± 17,6bc	11,0 ± 7,6cd
6	27,0 ± 22,0cA	26,8 ± 18,6cA	7,4 ± 7,7dB

Letras minúsculas distintas na coluna ou maiúsculas distintas na linha indicam valores diferentes ( $P < 0,05$ )

A porcentagem de formas reativas ao teste HO foi, em geral, inferior ao percentual de espermatozoides móveis. Para o meio B10, do primeiro ao quarto dia de resfriamento, a porcentagem de formas reativas ao teste HO foi, em média,  $32,4 \pm 4,1\%$ , inferior à de motilidade total; no quinto dia, os valores foram

### Teste hiposmótico para avaliação...

semelhantes, e no sexto, a porcentagem de formas reativas foi superior à de motilidade, indicando, possivelmente, outro sítio de lesão do espermatozóide, alterando a motilidade espermática, sem perda, em igual proporção, da funcionalidade da membrana plasmática. No meio B3 a porcentagem de formas reativas ao teste HO foi, em média,  $29,5 \pm 3,3\%$  inferior à de motilidade progressiva. No sexto dia de resfriamento, os valores permaneceram mais próximos, sendo a diferença de 8,2% menor do que a leitura média da motilidade.

No meio K, a diferença entre os valores médios da porcentagem de formas reativas ao teste HO e da porcentagem de células móveis, avaliada dentro de cada dia de armazenamento, foi bem maior do que a verificada nos outros meios (valor de HO, em média,  $63,5 \pm 3,9\%$  inferior ao da motilidade total), sugerindo que o meio à base de leite desnatado conferiu menor resistência ao estresse osmótico, quando comparado aos meios de armazenamento à base de gema de ovo. Esse dado é de extrema importância, pois, se forem levados em consideração somente as informações obtidas com as análises da motilidade (total e progressiva) e da morfologia espermática, principalmente nos primeiros dias de armazenamento, não se fará distinção entre os três meios para o armazenamento. Entretanto, quando se analisam os resultados do teste HO, constata-se que esses meios comportam-se diferentemente.

Não se observou correlação entre motilidade espermática e integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide. Isso foi, particularmente, observado no meio B10, no qual ocorreu queda brusca de motilidade espermática (total e progressiva) do quarto para o quinto dia de resfriamento, a qual não foi acompanhada por queda da porcentagem de formas reativas ao teste HO. A mesma tendência foi observada no meio diluidor B3 nos dias cinco e seis de resfriamento. No meio diluidor Kenney, índices indicativos de reduzido número de espermatozóides com membrana plasmática funcional foram notados antes de se observar queda da motilidade espermática. O meio diluidor B10 propiciou a menor longevidade espermática (Fig. 1), e foi um dos que melhor preservou, segundo os princípios do teste HO, a integridade da membrana plasmática, não indicando relação direta entre a longevidade

espermática e a integridade funcional da membrana. Watson (1995), em trabalho de revisão, relatou que, embora o declínio da motilidade espermática possa ser explicado com base em mudanças no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática da região da cauda do espermatozóide, é também possível que alteração na energia disponível ou danos aos elementos do axonema possam contribuir para esse declínio. Dessa forma, poderiam ser esperados resultados de baixa motilidade sem, contudo, encontrar alto índice de lesão na membrana plasmática. Isso explica, parcialmente, a menor longevidade espermática de amostras no meio B10 observada neste experimento. Nesse meio diluidor, pode ter ocorrido alteração na energia disponível ou danos aos elementos do axonema, sem alterar em igual proporção a integridade funcional da membrana plasmática.

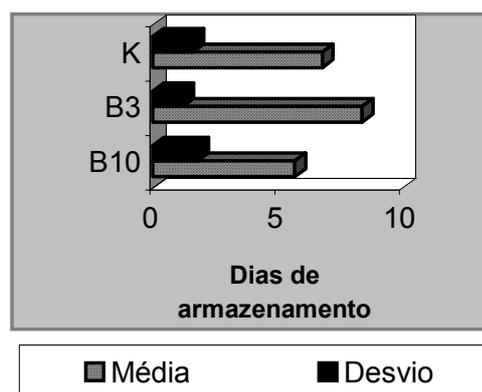


Figura 1. Longevidade do sêmen de sete garanhões, diluído em meio Kenney (K), meio Baken com 3% de gema de ovo (B3) e meio Baken com 10% de gema de ovo (B10), e resfriado a 5°C.

Dois aspectos devem ser considerados sobre a ausência de relação absoluta entre motilidade espermática e integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide. O primeiro é o fato de se poder encontrar espermatozóides com membrana plasmática íntegra, mas imóveis. Esse achado encontra respaldo nas afirmações de Watson et al. (1987). Esses autores quantificaram a lesão de membranas de espermatozóide equino submetido a choque térmico, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, e observaram que a

quebra celular induzida no espermatozóide equino pelo choque térmico é semelhante à observada em outros ungulados e ocorre numa variação de temperatura semelhante, isto é, abaixo de 15°C. A lesão das membranas na região da cabeça do espermatozóide parece ser progressiva, começando com a membrana plasmática e, posteriormente, envolvendo o acrossoma. Segundo esses pesquisadores, em contraste com o observado com o acrossoma, a mitocôndria parece ser lesada enquanto a membrana plasmática pode permanecer intacta, talvez indicando que a lesão é mais uma consequência direta do estresse térmico sobre as cristas mitocondriais, que uma consequência de mudanças do microambiente intracelular causado pela perda da integridade da membrana plasmática. O segundo aspecto é o fato de se ter observado, durante o experimento, que a população de espermatozoides com membrana plasmática íntegra foi, em geral, menor que a população de espermatozoides móveis. Nessa situação, provavelmente, está se tratando da resistência ao estresse osmótico. A motilidade avaliada antes do teste HO mostra o índice de funcionalidade das células quando armazenadas a 5°C. Após submeter a amostra à incubação em meio hiposmótico, constatam-se índices de funcionalidade inferiores aos de motilidade. Isso leva a refletir que se pode ter células móveis, mas pouco resistentes ao estresse osmótico, e, ainda, ter células imóveis, mas que mantiveram a integridade funcional da membrana plasmática, não sendo necessariamente a mesma subpopulação espermática avaliada nos dois testes de funcionalidade, indicando a complementaridade dos testes para diagnóstico do potencial de fertilização.

Os resultados com o teste HO sugeriram que os diluidores à base de gema de ovo preservaram melhor a membrana plasmática, ao manterem maior porcentagem de formas reativas que o meio diluidor à base de leite desnatado. Segundo White (1993), os fosfolípidios, principalmente os encontrados na gema do ovo, protegem o espermatozóide do choque térmico e também previnem o aumento do fluxo de cálcio para dentro do espermatozóide. Lagares et al. (1999), ao avaliarem a manutenção da motilidade e funcionalidade da membrana plasmática do espermatozóide equino, resfriado por 72 horas em diferentes diluidores, verificaram que os melhores resultados de integridade funcional da

membrana plasmática e da motilidade espermática foram obtidos quando o sêmen foi diluído em meios à base de leite. A diferença na composição de macromoléculas entre os meios diluidores ou a retirada de certos componentes da gema pela centrifugação pode explicar a diferença nos resultados obtidos.

Malmgren et al. (1992) também demonstraram que o meio à base de leite desnatado, comparado a outro à base de gema de ovo, foi melhor para preservar a motilidade dos espermatozoides equinos na temperatura ambiente e a 5°C, quando armazenado por 42 horas. O efeito da proporção da gema de ovo no meio diluidor pode, em parte, propiciar melhor proteção aos espermatozoides. No presente trabalho, a motilidade espermática no meio contendo 3% de gema foi melhor que no meio contendo 10% de gema e que no meio à base de leite. No trabalho de Malmgren et al. (1992) não se especificou a porcentagem de gema de ovo do diluidor utilizado. É importante salientar que neste experimento, nos dois primeiros dias de armazenamento, período semelhante ao observado por Malmgren et al. (1992), não foram detectadas diferenças quanto às características físicas do sêmen nos três diluidores utilizados.

Na Fig. 1 observa-se que o meio B3 apresentou melhores resultados de longevidade, porém nota-se que os valores acusados no teste HO não foram superiores aos do meio B10, o qual apresentou a menor longevidade espermática. O meio K apresentou queda brusca dos valores de HO, principalmente a partir do quarto dia de armazenamento, e teve longevidade semelhante à obtida no meio B10.

Na Tab. 4 observam-se valores de correlação de médio a baixo entre o teste HO e motilidade total, motilidade progressiva, vigor espermático e espermatozoides morfológicamente normais. O grau de associação encontrado entre essas variáveis é indicativo da existência de certo grau de dependência entre elas. Essa associação não foi maior devido ao fato de os fenômenos biológicos que originam os movimentos dos espermatozoides não serem somente dependentes da estrutura do espermatozóide. As correlações encontradas foram semelhantes às obtidas por Caiza de Cueva et al. (1997) e inferiores às relatadas por Rodriguez e Bustos-Obregon (1993), o que pode ser explicado pelo fato de esses últimos autores terem trabalhado com

### Teste hiposmótico para avaliação...

amostras obtidas diretamente do epidídimo e de ejaculados, os quais englobam gametas em maturação, onde estão ocorrendo mudanças das propriedades fisiológicas da membrana em paralelo à aquisição de motilidade, e gametas maduros.

Tabela 4. Correlação entre características usuais de avaliação do sêmen e resultado do teste hiposmótico no sêmen equino diluído, resfriado e armazenado a 5°C

	MT	MP	V	NOR
MT	-	-	-	-
MP	0,95*	-	-	-
V	0,76*	0,68*	-	-
NOR	-0,004 ns	-0,009 ns	-0,02 ns	-
HO	0,57*	0,59*	0,46*	0,16 ns

MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; V= vigor espermático; NOR= espermatozoides morfologicamente normais; HO= formas reativas ao teste hiposmótico (HO). \*= (P<0,05); ns= não significativo (P>0,05).

### CONCLUSÕES

Os resultados do teste HO sugerem que os diluidores à base de gema de ovo preservam melhor a membrana plasmática quando comparados ao diluidor à base de leite desnatado. Os valores obtidos no teste HO e a correlação entre esses e a motilidade espermática indicam que o espermatozoide responde ao estresse osmótico diferentemente da motilidade apresentada. O teste hiposmótico adiciona informações ao exame convencional do sêmen e pode ser utilizado para comparar diferentes processos de preservação do sêmen equino.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAIZA DE LA CUEVA, F.I.; RIGAU, T.; BONET, S. et al. Subjecting horse spermatozoa to hypoosmotic incubation: effects of ouabain. *Theriogenology*, v.47, p.765-784, 1997.
- JASKO, D.J. Evaluation of stallion semen. *Vet. Clin. North Am.: Equine Pract.*, v.8, p.129-148, 1992.
- JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. *Ars Vet.*, v.10, p.156-165, 1994.
- JASKO, D.J.; MORAN, D.M.; FARLIN, M.E. et al. Effect of seminal plasma dilution or removal on spermatozoal motion characteristics of cooled stallion semen. *Theriogenology*, v.35, p.1059-1067, 1991.
- KAYSER, J.P.; AMANN, R.P.; SHIDELER, R.K. et al. Effects of linear cooling rate on motion characteristics of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, v.38, p.601-614, 1992.
- KENNEY, R.M.; BERGMAN, R.V.; COOPER, W.L. et al. Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, v.21, p.327-336, 1975.
- KENNEY, R.M.; HURTGEN, J.P.; PIERSON, R. et al. *Society for theriogenology manual for clinical fertility evaluation of stallion*. Hasting: Society for Theriogenology, 1983. 100p.
- LAGARES, M.A. ; MEIRELLES, L.S.; WALD, V.B. et al. Manutenção da plasmática do espermatozoide equino no sêmen resfriado com diferentes diluentes. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.23, p.295-297, 1999.
- LAGARES, M.A.; PETZOLDT, R.; SIEME, H. et al. Preservação do sêmen fresco equino: Avaliação da integridade da membrana espermática sob condições hiposmóticas. *Arq. Fac. Vet. UFRGS*, v.26, p.29-42, 1998.
- LOOMIS, P.R. Factors affecting the success of artificial insemination with cooled, transported semen. *Proc. Am. Assoc. Equine Pract.*, v.38, p.629-647, 1992.
- MALMGREN, L.; OP DEN KAMP, B.; WÖCKNER, A et al. Motility patterns of equine spermatozoa stored under different conditions. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992, The Hague. *Proceedings...* The Hague: ICAR, 1992. p.1891-1893.
- MELLO, S.L.V. *Efeito da coleta fracionada de sêmen e de dois diluentes sobre a longevidade de espermatozoides de jumentos (Equus asinus) resfriado a 5°C*. 1998. 97f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte
- MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.51, p.77-78, 1999.
- NISHIKAWA, Y. *Studies on reproduction in horses*. Tokyo: Japan Racing Association, 1959. 340p.
- PARKS, J.E.; GRAHAM, J.K. Effects of criopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*, v.38, p.209-222, 1992.
- RODRIGUEZ, H.; BUSTOS-OBREGON, E. Hypoosmotic test and physiology of the epididymal and ejaculated stallion spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.48, suppl.1, p.86, 1993.
- USER'S guide: statistics. Version 5. Cary, NC: SAS Institute, 1990. 956p.
- SILVA FILHO, J.M. *Aspectos do manejo reprodutivo e do sêmen na inseminação artificial de égua*. 1994. 408f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG
- WATSON, P.F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.7, p.871-891, 1995.
- WATSON, P.F.; PLUMMER, J.M.; ALLEN, W.E. Quantitative assesment of membrane damage in cold-shocked spermatozoa of stallions. *J. Reprod. Fertil.*, suppl., p.651-653, 1987.
- WHITE, I.G. Lipids and calcium uptake of sperm in relation to cold shock and preservation: a review. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.5, p.639-658, 1993.