

## TESTE DE ENDOSMOSE (HOST) EM SÉMEN DE CAPRINOS DA RAÇA SERRANA

### BUCK SEMEN HOS TEST OF SERRANA BREED

G.M.B.C. Ferreira, J.P.F. Sousa, J.P. Barbas, e A.E.M. Horta

Departamento de Reprodução Animal, Estação Zootécnica Nacional – INIA,  
2000 Vale de Santarém

#### RESUMO

O sémen de quatro bodes da raça Serrana foi colhido quinzenalmente durante 22 meses através de vagina artificial para avaliação de todas as características seminais, cujos resultados completos foram apresentados noutra publicação. Neste trabalho apresentam-se os resultados da reacção endosmótica seminal a uma solução hipoosmótica de 100 mOsm/Kg, efectuada aos 5 e 25 minutos de incubação e traduzida na percentagem de espermatozóides (spz) com reacção positiva total ou parcial, durante 12 meses (n=195).

No total de colheitas efectuadas, a percentagem de spz com reacção positiva aos 25 minutos foi significativamente superior à dos 5 minutos de incubação (88,5% vs. 85,9%). Houve uma correlação significativa e positiva entre os valores lidos aos 5 e 25 minutos ( $r=0,49$ ,  $P<0,05$ ). A percentagem de spz reagindo positivamente ao teste, apresentou diferenças significativas entre animais, destacando-se os valores mínimos de 81,38% e 85,96% e máximos de 90,35% e 90,96%, respectivamente aos 5' e 25'. Não se observaram diferenças significativas entre meses e entre estações do ano para as endosmoses aos 5 minutos ou aos 25 minutos. A percentagem de endosmoses positivas, em qualquer dos tempos de medição, apresentou correlações significativas e negativas com a mobilidade individual ( $r=-0,17$  e  $r=-0,18$ ) e positivas com a percentagem de spz normais ( $r=0,15$  e  $r=0,21$ ), respectivamente aos 5 e 25 minutos. Destaca-se a correlação significativamente negativa entre as endosmoses e a percentagem de spz com anomalias da cauda. ( $r=-0,18$ , e  $r=-0,21$ , respectivamente aos 5' e 25'). As correlações verificadas entre a proporção de endosmoses positivas e os três parâmetros seminais qualitativos referidos deveram-se sobretudo a dois bodes, que registaram valores de correlação elevados para qualquer dos casos referidos. É ainda de referir que um dos bodes não apresentou correlações significativas para nenhum dos casos relatados. Para além das referidas, não foram observadas correlações significativas entre as endosmoses e quaisquer outras características seminais (volume, mobilidade massal, concentração espermática, spz vivos, anomalias da cabeça e da peça intermediária e integridade do acrossoma). De igual modo, não foram encontradas correlações significativas ( $P>0,05$ ) entre as endosmoses e as variáveis ambientais como o fotoperíodo ( $r=-0,06$ ), e as temperaturas média ( $r=0,07$ ) e máxima ( $r=0,09$ ) diárias.

Ficou patente a inexistência de variações sazonárias da percentagem de endosmoses positivas, sendo evidente uma forte variação entre indivíduos que condicionam o aparecimento de correlações com outras características seminais.

#### SUMMARY

The semen of adult 4 bucks of the Serrana breed was collected every 15 days during 22 months to evaluate all seminal parameters and complete results were published elsewhere. This work reports results during 12 months (195 ejaculates) on the semen HOST test with a hypoosmotic solution of 100 mOsm/Kg, incubated for 5' and 25' and expressed as the percentage of sperm with partial or total endosmotic reaction.

In overall ejaculates, the percentage of sperm with positive reaction was significantly higher at 25' than at 5' of incubation (88,5% vs. 85,9%). There was a significant and positive correlation between values from 5' and 25' ( $r=0,49$ ,  $P<0,05$ ). The percentage of sperm positively reacting to the HOS test, presented significant differences between animals, the lower levels being 81,38% e 85,96% and the higher ones 90,35% e 90,96% at 5' and 25', respectively. There

were no significant differences between months and season of the year either at 5' or 25' of incubation. The percentage of positive endosmosis at 5' and 25', were significantly and negatively correlated with individual sperm motility ( $r=-0,17$  e  $r=-0,18$ , respectively) and positively correlated with normal sperm rate ( $r=0,15$  e  $r=0,21$ , respectively). It is highlighted the significantly negative correlation between positive endosmosis at 5' and 25' and the rate of tail abnormalities ( $r=-0,18$ , e  $r=-0,21$ , respectively). All these correlations were mainly due to 2 of the bucks presenting a high relationship. One of the males did not present significant correlations with any of the studied variables. There were no significant correlations with any of the other seminal parameters measured (volume, sperm concentration, live sperm, head and mid piece abnormalities and acrosome integrity). Also, there were no significant correlations between positive endosmosis and environmental variables such as photoperiod, medium and maximum daily temperatures ( $P>0.05$ ).

We may conclude that endosmotic sperm reaction in this breed is not affected by seasonal factors and that the individual male effect influences the appearance of significant correlations with other seminal parameters.

## INTRODUÇÃO

A integridade da membrana espermática é importante, não só para o metabolismo da célula, mas também para a fertilização. Vários acontecimentos durante a fertilização (incluindo a capacitação, a reacção do acrossoma e a união do espermatozóide à superfície do óvulo) exigem uma membrana espermática bioquimicamente activa, não ocorrendo a fertilização mesmo que esta esteja fisicamente intacta (Correa & Zavos, 1994; Jeyendran *et al.*, 1984). O teste que estuda a integridade funcional da membrana espermática é o teste da endosmose ou HOST (Hypoosmotic Swelling Test), que parece ser o que melhor se correlaciona com os resultados de fertilidade (Artiga, 1994; Cortés *et al.*, 1993).

Quando o espermatozóide é exposto a condições hipoosmóticas há entrada de água pela membrana espermática, numa tentativa de atingir um equilíbrio osmótico entre os compartimentos intracelular e extracelular. Este influxo de água aumenta o volume da célula e provoca a dilatação da membrana plasmática, enrolando-se o flagelo no seu interior. A cauda é particularmente susceptível a esta condição, torcendo-se em helicoidal (reacção positiva). Esta situação é facilmente observada com um microscópio de contraste de fase, sendo suficiente contar 100 espermatozoides para validar o teste (Jeyendran *et al.*, 1984; Rota *et al.*, 2000; Artiga, 1994). Esta reacção é um sinal de que o transporte de água através da membrana ocorreu normalmente, isto é, um sinal de que a membrana está fisicamente e funcionalmente intacta, ou seja, bioquimicamente activa (Jeyendran *et al.*, 1984, Correa & Zavos, 1994).

A osmolaridade ideal da solução é a que produz o maior efeito possível (maior percentagem de espermatozoides reactivos), sem resultar na lise das células (Rota *et al.*, 2000). Esta osmolaridade, bem como o tempo no qual se atinge o valor máximo de reacções positivas e a temperatura ideal para a realização do teste, varia com a espécie, havendo estudos para humanos, bovinos, ovinos, porcos, truta arco-íris e cães, que nem sempre são coincidentes nos valores de referência indicados (Jeyendran *et al.*, 1984; Correa & Zavos, 1994; Revell & Mrode, 1994; Espinosa *et al.*, 1992; Vázquez, 1980; Casado, 1994; Vazquez *et al.*, 1997; Cabrita *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 1993). De acordo com Guraya (1987) a diferença encontrada entre espécies parece dever-se a variações nas propriedades físicas e bioquímicas da membrana espermática. Embora apresentando valores diferentes quanto às percentagens de endosmose obtidas, Cortés *et al.* (1993) e Sousa *et al.* (2000) indicam que a solução hipoosmótica aconselhada para a determinação e selecção de indivíduos de maior qualidade seminal, é a solução de 100 mOsm/Kg, e que a maior proporção de espermatozoides com reacção positiva é encontrada nos primeiros vinte minutos do teste.

Neste trabalho, a reacção endosmótica de sêmen de caprinos serranos a um meio hipoosmótico com 100 mOsm/Kg, foi avaliada em diferentes animais, meses e estações do ano, e correlacionada com outras características seminais.

## MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi realizado na Estação Zootécnica Nacional, localizada no Vale de Santarém a uma latitude de 39° e 12' N, durante 22 meses, desde Março de 1999 até Dezembro de 2000. Ao longo do total destes 22 meses efectuaram-se 100 sessões de colheitas seminais, para um total de 344 ejaculados estudados, segundo a seguinte distribuição:

Mês	Jan	Fev	Ma	Abr	Mai	Jun	Jul	Ag	Set	Out	No	De	Total
Sessões	3	3	10	20	13	8	8	5	8	7	8	7	100
Colheitas	12	11	29	59	43	28	29	19	30	27	32	25	344

Os ejaculados foram avaliados em função das suas características quantitativas e qualitativas, registando-se e estudando-se o volume, a concentração, o número total de espermatozóides, a mobilidade massal, a mobilidade individual, as percentagens de espermatozóides normais, anormais, vivos e mortos. Durante os últimos 12 meses (Dezembro a Dezembro) procedeu-se à realização de testes de permeabilidade da membrana (teste de endosmose com 100 mOsm/kg) e da integridade do acrossoma. Neste trabalho são apresentados somente os resultados referentes aos testes de endosmose e suas correlações com outras características seminais, podendo os restantes ser consultados no relatório de estágio de Ferreira (2001).

Foram utilizados quatro bodes adultos de raça Serrana, com 4 anos de idade, estimulados a saltar para vagina artificial por uma fêmea ovariectomizada da mesma raça. Os machos foram mantidos juntos durante todo o tempo de realização do estudo, num parque ao ar livre com cobertura. A sua alimentação baseou-se em feno, silagem e luzerna desidratada, apresentando uma média de pesos de  $69,5 \pm 1,5$  Kg, sem variações significativas ao longo do ano.

A solução hipoosmótica de 100 mOsm/kg foi constituída por citrato tri-sódico 2H<sub>2</sub>O (1,04g) e água destilada (100 ml). O teste de endosmose (HOST) consistiu na diluição de 0,1 ml de sémen puro em 1 ml da solução hipoosmótica durante 5 e 25 minutos. Passado o tempo correspondente fixou-se uma gota da diluição com glutaraldeído a 2% em BL-1, um meio preparado da seguinte forma:

Composição química do BL-1 (Pursel et al., 1972)	
Reagente	Quantidade
Glucose	2,9 g
Citrato tri-sódico 2 H <sub>2</sub> O	1 g
Bicarbonato de sódio	0,2 g
Água destilada	100 ml

A diluição do glutaraldeído em BL-1 foi feita juntando 8 ml da solução mãe de glutaraldeído a 25% em 92 ml de BL-1, obtendo-se uma solução com uma diluição final de glutaraldeído de 2%. Após a fixação da gota hipoosmótica com glutaraldeído a 2% em BL-1, realizou-se um esfregaço. Após a secagem, contaram-se 100 espermatozóides em microscópio de contraste de fase com 1000 aumentos, registando-se a percentagem dos que apresentaram endosmose positivas (somatório das positivas totais e parciais) e endosmose negativas. O meio de 100 mOsm/kg foi utilizado para caracterizar a reacção endosmótica seminal dos 4 bodes durante 12 meses, para avaliação dos efeitos bode, mês e estação do ano, bem como a sua correlação com outros parâmetros seminais e ambientais (temperaturas e fotoperíodo).

Todos os dados referentes a temperaturas e a fotoperíodos foram cedidos pelo Instituto Nacional de Meteorologia e Geofísica (INMG). Os dados obtidos foram registados e guardados numa folha de cálculo (programa Excel da Microsoft). As variáveis sazonárias, temperatura e

fotoperíodo, foram estudadas para correlações com todas as variáveis seminais, as quais foram também correlacionadas entre si, pelo método de Pearson. As interações entre os factores bode, mês e estação do ano com as características seminais foram avaliadas através da análise de variância múltipla (MANOVA). Nos casos das variáveis em que não houve interacção os efeitos isolados do bode, mês e estação do ano, foram aferidos através de análises de variância simples (ANOVA) e de testes de comparação múltipla pelo método das menores diferenças significativas (LSD). Todos estes testes estatísticos, assim como os gráficos apresentados foram processados no programa Statistica (StatSoft Inc., 1995).

## RESULTADOS

No conjunto dos 12 meses de estudo com a solução hipoosmótica de 100 mOsm/kg, a percentagem de endosmose positivas totais aos 25 minutos, apresentou um valor significativamente superior à dos 5 minutos (88,5 % vs. 85,9 %, Tabela 1).

**Tabela 1** - Diferenças entre endosmose positivas aos 5 e 25 minutos de leitura (100 mOsm/kg).

	n	Endosmose positivas (%) (média ± dp)	ANOVA
Endosmose aos 5'	195	85,92 ± 14,53 a	a <> b: F <sub>[1;388]</sub> =4,18
Endosmose aos 25'	195	88,49 ± 9,76 b	P = 0,042

Os valores médios das endosmose positivas variaram significativamente entre bodes, tendo o bode 617 apresentado os menores valores, quer aos 5 minutos quer aos 25 minutos de reacção, com 81,38% e 85,96%, respectivamente. Os valores mais elevados foram encontrados no bode 619, com 90,35% de endosmose positivas aos 5 minutos e 90,96% aos 25 minutos (Tabela 2, Gráfico 1).

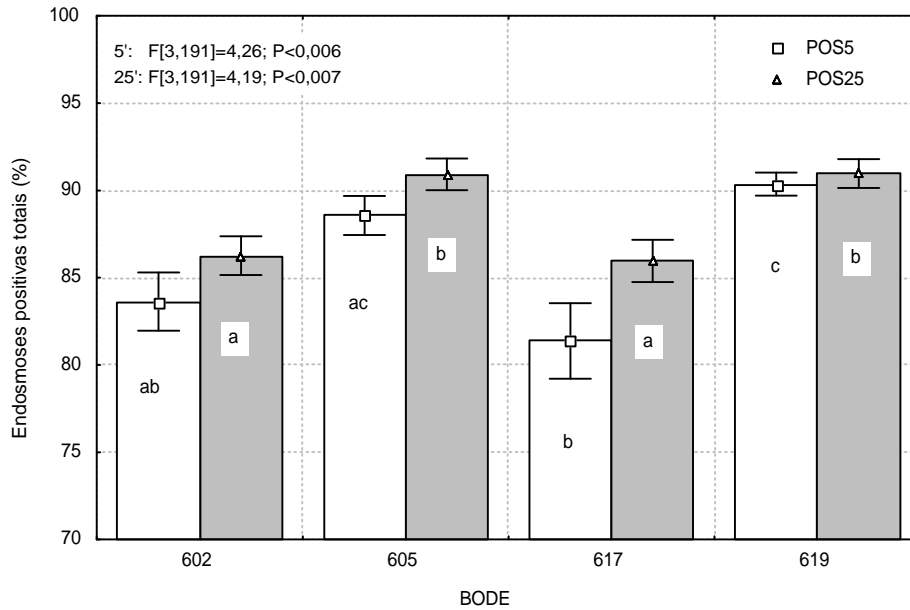
**Tabela 2** - Diferenças entre bodes para as endosmose positivas (100 mOsm/kg).

Bode	n	End Pos 5` (%)	End Pos 25` (%)
		média ± dp	média ± dp
602	49	83,63 ± 15,87 ab	86,26 ± 10,54 a
605	48	88,56 ± 9,43 ac	90,92 ± 7,66 b
617	50	81,38 ± 20,29 b	85,96 ± 11,30 a
619	48	90,35 ± 6,43 c	90,96 ± 7,98 b
Anova		F <sub>[3;191]</sub> =4,2562 P=0,0062	F <sub>[3;191]</sub> =4,1849 P=0,0068

Não se observaram diferenças significativas entre meses do ano para as endosmose aos 5 minutos (F<sub>[11;183]</sub>=1,13, P=0,34) ou aos 25 minutos (F<sub>[11;183]</sub>=1,31, P=0,22). Entre as estações do ano, não foram igualmente observadas diferenças significativas para as endosmose aos 5 (F<sub>[3;191]</sub>=0,52, P=0,67) e aos 25 (F<sub>[3;191]</sub>=1,12, P=0,34) minutos.

As endosmose positivas aos 5 e 25 minutos, apresentaram uma elevada correlação positiva e significativa entre si (r=0,49, P<0,05). A percentagem de endosmose positivas, em qualquer dos tempos de medição (Tabela 3), apresentou correlações significativas negativas com a mobilidade individual (r=-0,17 e r=-0,18, aos 5 e 25 minutos, respectivamente) e positivas com a percentagem de espermatozóides normais (r=0,15 e r=0,21, aos 5 e 25 minutos, respectivamente). Destaca-se a correlação significativamente negativa entre as endosmose e a percentagem de espermatozóides com anomalias da cauda. (r=-0,18, para as endosmose medidas aos 5 minutos e r=-0,21, para as endosmose medidas aos 25 minutos; Gráfico 2).

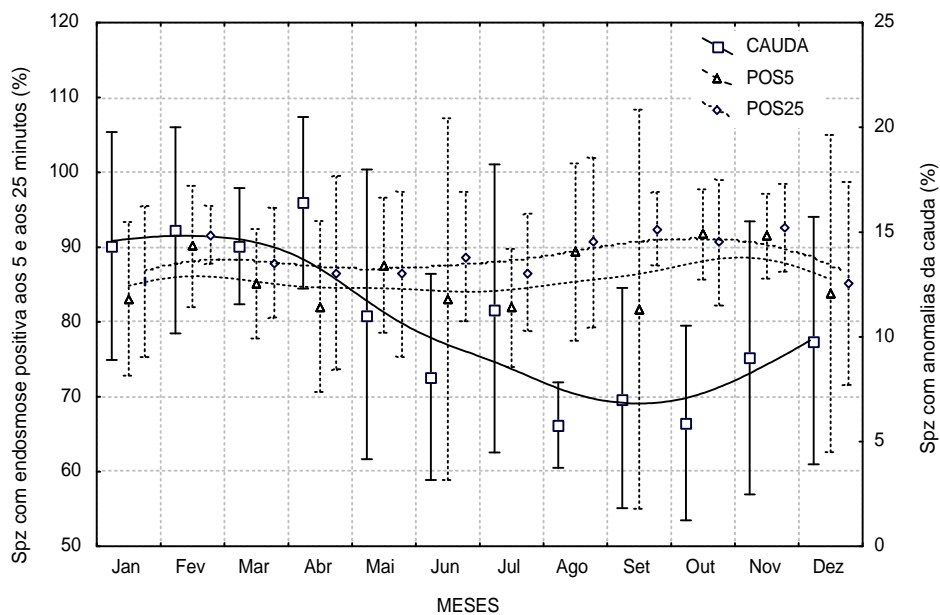
**Gráfico 1** - Diferenças entre bodes para as endosmoses positivas totais aos 5 e 25 minutos (média e erro padrão)



**Tabela 3.** Correlações significativas entre as endosmoses positivas e outras características seminais (P<0,05).

	Mobilidade Individual	Espermatozóides Normais	Anomalias da Cauda
Pos 5	-0,17	0,15	-0,18
Pos 25	-0,18	0,21	-0,21

**Gráfico 2.** Variação anual da percentagem de espermatozóides com endosmose positiva e sua correlação com a percentagem de espermatozóides com anomalias da cauda ( $r(5')=-0,18$ ;  $r(25')=-0,21$ ;  $p<0,05$ )



As correlações verificadas entre a proporção de endosmose positivas e os três parâmetros qualitativos referidos devem-se sobretudo aos bodes 605 e 617, que registam valores de correlação elevados para qualquer dos casos referidos (Tabela 4). É ainda de referir que o bode 602 não apresenta correlações significativas para nenhum dos casos relatados. Assim, estas correlações com as endosmose são influenciadas pelas diferenças existente entre bodes, já que nem todos os bodes as apresentam.

**Tabela 4.** Correlações significativas encontradas para cada bode entre as endosmose positivas e a mobilidade individual (MI), espermatozoides normais (Normais) e anomalias da cauda (AC).

Bode	Pos 5' x MI (r e P)	Pos 25' x MI (r e P)
602	-0,10 P=0,50	-0,02 P=0,92
605	-0,31 P=0,03	-0,17 P=0,24
617	-0,21 P=0,13	-0,48 P=0,0004
619	-0,05 P=0,73	-0,01 P=0,95
	Pos 5' x Normais (r e P)	Pos 25' x Normais (r e P)
602	+0,02 P=0,87	+0,06 P=0,74
605	+0,42 P=0,003	+0,26 P=0,078
617	+0,18 P=0,21	+0,46 P=0,0007
619	+0,24 P=0,098	+0,14 P=0,35
	Pos 5' x AC (r e P)	Pos 25' x AC (r e P)
602	-0,04 P=0,797	-0,05 P=0,74
605	-0,40 P=0,005	-0,23 P=0,12
617	-0,19 P=0,178	-0,40 P=0,004
619	-0,29 P=0,049	-0,19 P=0,20

Para além das referidas, não foram observadas correlações significativas entre as endosmose e quaisquer outras características seminais (volume, mobilidade massal, concentração espermática, espermatozoides vivos, anomalias da cabeça e da peça intermediária e integridade do acrossoma). De igual modo, não foram encontradas correlações significativas ( $P > 0,05$ ) entre as endosmose e as variáveis ambientais como o fotoperíodo ( $r = -0,06$ ), e as temperaturas média ( $r = 0,07$ ) e máxima ( $r = 0,09$ ) diárias.

## DISCUSSÃO CONCLUSÕES

Verificou-se uma forte correlação entre as endosmose positivas nos dois tempos de medição, havendo um aumento desta proporção dos 5 para os 25 minutos, contrariando os resultados de Cortés *et al.*, 1993, ainda que estes autores afirmem que os seus dados são apenas uma orientação, já que foram obtidos de amostragem insuficiente para tratamento estatístico. Os valores obtidos em qualquer dos tempos, no presente trabalho, são muito superiores aos divulgados por estes autores, havendo um aumento significativo entre os 5 e 25 minutos de leitura. Este aumento está entretanto de acordo com o observado para outras espécies (Jeyendran *et al.*, 1984; Correa & Zavos, 1994; Revell & Mrode, 1994; Espinosa *et al.*, 1992; Vázquez, 1980; Casado, 1994; Vazquez *et al.*, 1997; Cabrita *et al.*, 1999; Gil *et al.*, 1993).

Observou-se uma correlação negativa entre a proporção de espermatozoides que reagiram positivamente ao teste da endosmose e a de espermatozoides com anomalias da cauda, o que se compreende facilmente pelo facto de ser necessário a cauda estar fisicamente e funcionalmente normal para sofrer endosmose (Jeyendran *et al.*, 1984, Correa & Zavos, 1994).

Contudo observou-se uma correlação negativa entre a percentagem de espermatozoides com endosmose positiva e a mobilidade individual, sabendo-se que esta última também depende da integridade e funcionalidade da cauda. Esta aparente contradição explica-se pela diferença significativa entre as correlações das endosmose positivas, quando comparados os quatro bodes. De facto, e inexplicavelmente, apenas dois bodes apresentam esta correlação negativa entre as endosmose positivas e a mobilidade individual, influenciando o resultado global.

Ficou patente neste trabalho a inexistência de variações sazonárias da percentagem de endosmose positivas, sendo evidente uma forte variação entre indivíduos que condicionam o aparecimento de correlações com outras características seminais. Os valores médios apresentados são sempre elevados, não constituindo por isso risco para um bom desempenho reprodutivo dos animais.

## BIBLIOGRAFIA

- Artiga, C.G. (1994). Test de endosmose en ovino. VII Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Murcia. Ponencias y Comunicaciones, Sesión de andrología. pp: 77-81.
- Cabrita, E.; Alvarez, R.; Anel, E. e Herráez, M.P. (1999). The hypoosmotic swelling test performed with coulter counter: a method to assay functional integrity of sperm membrane in rainbow trout. *Animal Reproduction Science*, 55: 279-287.
- Casado, P.G. (1994). El test de resistencia osmótica en porcino. VII Jornadas Internacionales de Reproducción Animal. Murcia. Ponencias e Comunicaciones, Sesión de andrología. pp: 83-86.
- Correa, J.R. e Zavos, P.M. (1994). The hypoosmotic swelling test: its employment as an assay to evaluate the functional integrity of the frozen-thawed bovine sperm membrane. *Theriogenology*, 42: 351-360.
- Cortés, S.; Nuñez, R. e Vázquez, I. (1993). Capacidad de reacción a endosmose del espermatozoide de macho cabrío. 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal. Luso. Comunicações livres, Volume II. pp: 224-230.
- Espinosa, E.; Solanilla, E.; Gil, L.; Josa, A.; Falceto, M.V. e Cruz, J.I. (1992). The influence of temperature, osmolarity and dilution on the HOS test in bovine semen. 12th International Congress on Animal Reproduction. Volume I. pp: 435-437.
- Ferreira, G.M.B.C. (2001). Relatório de Estágio Curricular de Licenciatura em Medicina Veterinária, ICBAS-UP, EZN.
- Gil, J.E.R.; Montserrat, A.; Miró, J. e Rigau, T. (1993). Aplicación del test endosmótico en el análisis seminal canino. 5º Simpósio Internacional de Reprodução Animal. Luso. Comunicações livres, Volume II. pp: 525-531.
- Guraya, S.S. (1987). *Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals*. SS Guraya. Berlin: Springer-Verlag. pp: 307-335.
- Jeyendran, R.S.; Ven, H.H.V.; Pelaez, M.P.; Crabo, B.G. e Zaneveld, L.J.D. (1984). Development of an assay to assess functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J. Reprod. Fert.*, 70: 219-228.
- Pursel, V.G.; Johnson, L.A. e Schulman, L.L. (1972). Loss of boar spz fertilizing capacity associated with altered acrosome morphology during in vitro storage. VII Inter. Cong. Animal Reprod. A. I., 2: 1595-1600
- Revell, S.G. e Mrode, R.A. (1994). An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*, 36: 77-86.
- Rota, A.; Penzo, N.; Vincenti, L. e Mantovani, R. (2000). Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. *Theriogenology*, 53(15): 1415-1420.
- Sousa, J.P.F., Barbas, J.P., Ferreira, G.M.B.C. e Horta, A.E.M. (2000). Variação anual das características seminais em bodes da raça Serrana. X Congresso de Zootecnia "Progressos Zootécnicos nos Países de Língua Portuguesa", 2-4 Nov. 2000, Vale de Santarém, p. 87 (submetido à Rev. Port. Zoot.)
- StatSoft Inc., (1995). - *STATISTICA for Windows (computer program manual)*. Tulsa, OK
- Vázquez, I. (1980). Nuevos métodos de valoración del semen en reproductores ovinos y porcinos. Tesis. Universidad de León.
- Vázquez, J.M.; Martínez, E.A.; Martínez, P.; Artiga, C.G. e Roca, J. (1997). Hypoosmotic swelling of boar spermatozoa compared to other methods for analysing the sperm membrane. *Theriogenology*, 47: 913-922.