



Anais da

Reunião Anual da  
**IV ABRAA**  
Associação Brasileira de Andrologia Animal

7 e 8 de junho de 2019



**ABRAA**  
Associação Brasileira de Andrologia Animal

**ORGANIZADORES**

**Alexandre Rossetto Garcia**  
Médico-Veterinário  
Pesquisador A da Embrapa Pecuária Sudeste  
São Carlos, SP

**José Roberto Potiens**  
Médico-Veterinário  
Diretor de Produção da Seleon Biotecnologia  
Itatinga, SP

**Maurício Antonio Silva Peixer**  
Médico-Veterinário  
Diretor da Bio Biotecnologia Animal  
Brasília, DF

**REVISÃO LINGUÍSTICA E ORTOGRÁFICA**  
De responsabilidade dos autores

**PROJETO GRÁFICO E EDITORAÇÃO ELETRÔNICA**  
Divisão da Editora UFMS

**COMISSÃO ORGANIZADORA**  
ABRAA - Associação Brasileira de Andrologia Animal



**FICHA TÉCNICA**

Reunião Anual da  
**IV ABRAA**  
Associação Brasileira de Andrologia Animal  
Goiânia, 7 e 8 de Junho de 2019

Comissão Organizadora

**PRESIDENTE**

*Eliane Vianna da Costa e Silva*

**VICE-PRESIDENTE**

*Neimar Correa Severo*

**PRIMEIRA SECRETÁRIA**

*Teresinha Inês de Assumpção*

**SEGUNDA SECRETÁRIA**

*Letícia Zoccolaro Oliveira*

**PRIMEIRA TESOUREIRA**

*Maria Isabel Mello Martins*

**SEGUNDO TESOUREIRO**

*Marcelo George Mungai Chacur*

**DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO**

*Alexandre Rossetto Garcia*

**DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO**

*José Roberto Potiens*

**DIRETOR TÉCNICO CIENTÍFICO**

*Maurício Antonio Silva Peixer*

**DIRETORA DE COMUNICAÇÃO E MARKETING**

*Renata Lançoni*

**DIRETOR COMERCIAL**

*Athos de Assumpção Pastore*

**PRIMEIRO CONSELHEIRO FISCAL**

*Rubens Paes de Arruda*

**SEGUNDO CONSELHEIRO FISCAL**

*Luis Alfredo Garcia Deragon*

**TERCEIRO CONSELHEIRO FISCAL**

*Rodrigo Freitas Bittencourt*

**CONSELHEIRO FISCAL SUPLENTE**

*Fernando Galvani*

**REVISORES Ad Hoc**

Alexandre Rossetto Garcia  
Embrapa Pecuária Sudeste - SP

André Luís Rios Rodrigues  
Universidade Federal Fluminense - RJ

Athos de Assumpção Pastore  
Androvet - SP

Carlos Frederico Martins  
Embrapa Cerrados - DF

Cezinande de Meira  
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - SP

Eliane Vianna da Costa e Silva  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - MS

Eneiva Carla Carvalho Celeghini  
Universidade de São Paulo - SP

Flavio Antonio Barca Junior  
Universidade Norte do Paraná - PR

Frederico Ozanan Papa  
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - SP

Ivo Pivato  
Universidade de Brasília - DF

João Henrique Moreira Viana  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF

José Antônio Dell' Aqua Jr  
Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - SP

José Roberto Potiens  
Seleon Biotecnologia - SP

Letícia Zoccolaro Oliveira  
Universidade Federal de Minas Gerais - MG

Lílian Kátia Ximenes Silva  
Universidade da Amazônia - PA

Luciana Keiko Hatamoto-Zervoudakis  
Universidade Federal de Mato Grosso - MT

Marcelo George Mungai Chacur  
Universidade do Oeste Paulista - SP

Margot Alves Nunes Dode  
Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia - DF

Maria Isabel Mello Martins  
Universidade Estadual de Londrina - PR

Maurício Antonio Silva Peixer  
Bio Biotecnologia Animal - SP

Neimar Correa Severo  
Alta Genetics Brasil - MG

Priscila Reis Kahwage  
Exército do Brasil - PA

Renata Lançoni  
Médica Veterinária Autônoma - SP

Rodrigo Freitas Bittencourt  
Universidade Federal da Bahia - BA

Rubens Paes de Arruda  
Universidade de São Paulo - SP

Teresinha Inês Assumpção  
Universidade Federal de Uberlândia - MG

---

ISSN: 978-85-0000-000-0  
Depósito Legal na Biblioteca Nacional  
1ª edição  
Formato digital (2019)

## Osmolaridade ideal para execução do teste hiposmótico no sêmen *in natura* de ovinos (*Ovis aries*)

Alexandre Rossetto Garcia<sup>1</sup>  
alexandre.garcia@embrapa.br

Ana Beatriz Bossois Moura<sup>2</sup>  
Narian Romanello<sup>3</sup>

Jeferson Ferreira da Fonseca<sup>4</sup>  
Felipe Zandonadi Brandão<sup>2</sup>

Messy Hannear de Andrade Pantoja<sup>5</sup>

Andréa do Nascimento Barreto<sup>6</sup>

Marco Antonio de Paula Sousa<sup>6</sup>

Daniela Botta<sup>6</sup>

Alessandro Giro<sup>6</sup>

**Abstract:** The study aimed to establish the most suitable osmolarity range of the hypoosmotic solution for testing the membrane integrity in raw semen of rams. Sodium citrate and fructose based solutions (S) with the following osmolarities (mOsm/L) were used: 50 (S1), 75 (S2), 100 (S3), 125 (S4), 150 (S5), 175 (S6), 200 (S7), 250 (S8), 290 (S9) and 300 mOsm/L (S10). Nine mature Santa Ines rams (21.5±0.5 months; 72.9±1.6 kg) had semen collected one month apart. After the hypoosmotic swelling test (HOST) the ejaculates were evaluated using a phase-contrast microscope. A total of 200 spermatozoa were counted and sperm cells were classified as spermatozoa with coiled tails (CD, %), strongly coiled tail (CFD, %) or non-coiled tails. According to CD, S1, S2, S3, S4, S5, S6 and S7 were superior to S8, S9 and S10 (P<0,05). According to CFD, S2, S3, S4, S5, S6 and S7 were superior to S8, S9 and S10 (P<0,05). Results suggest that the 75 up to 200 mOsm/L solution would be best for using in HOST when raw semen of rams is analyzed.

**Keywords:** ram; sperm; hypoosmotic solution.

**Palavras-chave:** ovinos; espermatozoide; solução hiposmótica.

**Introdução** – A expansão da ovinocultura tem tido destaque nas últimas décadas em diversas regiões do país, sendo uma atividade atrativa para produção de leite, carne e couro de qualidade<sup>1</sup>. Contudo, inúmeras biotécnicas da reprodução aplicadas ao sêmen ovino são baseadas em métodos desenvolvidos para outras espécies<sup>2</sup>. Assim, torna-se crucial a execução de estudos espécie-

<sup>1</sup> Embrapa Pecuária Sudeste.

<sup>2</sup> Universidade Federal Fluminense.

<sup>3</sup> Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/USP.

<sup>4</sup> Embrapa Caprinos e Ovinos.

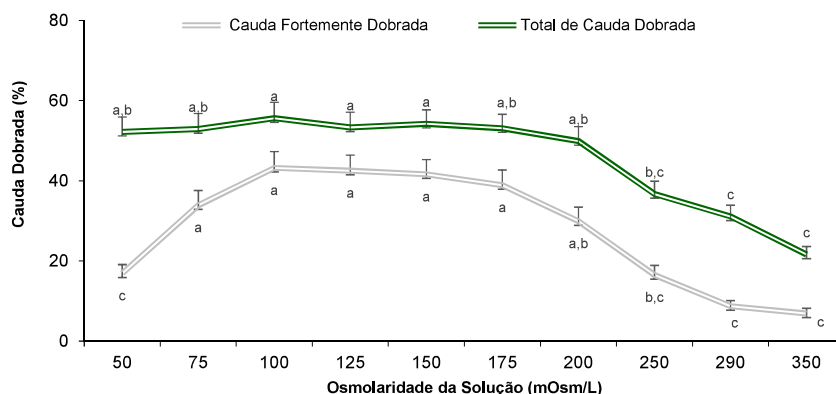
<sup>5</sup> Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos/USP.

<sup>6</sup> Universidade Federal do Pará.

-específicos que possam melhorar a eficiência reprodutiva desses animais. O teste hiposmótico (HOST) é uma técnica diagnóstica capaz de indicar a condição estrutural da membrana espermática, sendo executada com osmolaridade já estabelecida e relatada na literatura, em espécies como bovinos e equinos<sup>3,4</sup>. Porém, para os ovinos, essa referência ainda não foi propriamente estabelecida. As membranas celulares são responsáveis pela homeostase, por possibilitarem transporte seletivo de moléculas entre os meios intra e extracelular<sup>5</sup>. Quando o espermatozoide é inserido em ambiente hiposmótico, o solvente do meio extracelular tende a entrar na célula, a fim de promover equilíbrio celular<sup>6</sup>. O influxo de solvente provoca turgidez celular, fazendo com que a cauda espermática se dobre, indicando que a membrana espermática se encontra íntegra e funcional<sup>7</sup>. Assim, considerando a necessidade de refinamento de técnicas reprodutivas para a espécie, o objetivo do trabalho foi estabelecer a osmolaridade mais adequada da solução hiposmótica usada para avaliação da integridade da membrana espermática no sêmen *in natura* de ovinos.

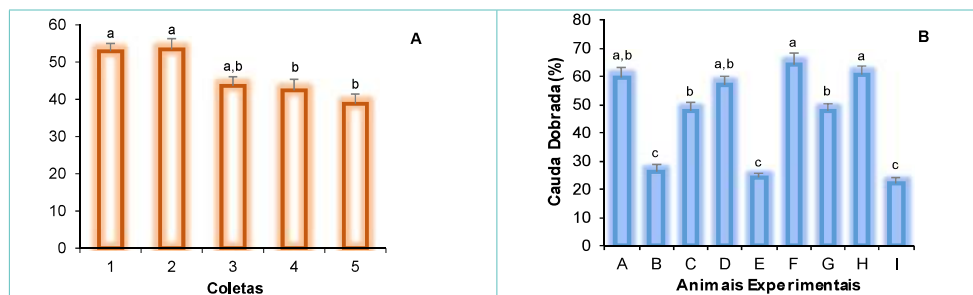
**Material e Métodos** - O experimento foi conduzido de janeiro a maio de 2016, na Embrapa Pecuária Sudeste, em São Carlos-SP, Brasil. Foram utilizados 9 reprodutores ovinos Santa Inês, em grupo experimental homogêneo (21,5±0,5 meses, 72,9±1,6 kg e ECC 3,3±0,1). Os animais foram mantidos em lote único sob as mesmas condições de manejo nutricional e sanitário, permanecendo em confinamento, com fornecimento diário de dieta composta por 80% volumoso e 20% de concentrado, com acesso *ad libitum* a água e sal mineral. A avaliação da integridade de membrana plasmática consistiu na utilização de soluções hiposmóticas, composta por D-frutose e citrato de sódio dihidratado. As soluções apresentavam 10 osmolaridades diferentes (mOsm/L): 50 (S1), 75 (S2), 100 (S3), 125 (S4), 150 (S5), 175 (S6), 200 (S7), 250 (S8), 290 (S9) e 300 (S10), determinadas por extrapolação alométrica em relação à espécie caprina<sup>2</sup>. O sêmen foi coletado mensalmente por vagina artificial, totalizando 5 coletas/animal. Após a coleta, o sêmen *in natura* foi avaliado quanto aos aspectos quantitativos. Atendendo às premissas de normalidade para a espécie<sup>8</sup>, o ejaculado era destinado aos tratamentos. Uma alíquota de 20 µL de sêmen foi adicionada a cada uma das diferentes soluções hiposmóticas (500 µL), sendo as amostras homogeneizadas e incubadas a 37°C por 60 minutos. Após, foram adicionados 500 µL de solução formol-salina tamponada e as amostras mantidas a 5°C até a análise. Foram avaliadas 200 células por amostra, em microscopia de contraste de fase (1000x)<sup>9</sup>. Os espermatozoides foram classificados como portadores de membrana plasmática íntegra ao apresentar intumescimento celular visualizado mediante o dobramento da cauda<sup>3</sup>. Adicionalmente ao total caudas dobradas (CD, %), as células que apresentaram forte enrolamento da cauda (CFD, %) também receberam classificação, a fim de minimizar o efeito de possíveis defeitos morfológicos do ejaculado sobre o teste hiposmótico. Para a contagem de CD foram consideradas todas as células que apresentavam qualquer tipo de dobra na cauda, incluindo a CFD. Para análise estatística, os dados de integridade de membrana plasmática foram submetidos à avaliação da normalidade dos resíduos, seguida de análise de variância. Em caso de significância, as médias foram comparadas pelo teste de Tuckey. O nível de significância previamente adotado foi de 5%.

**Resultados e Discussão** - A CD e a CFD apresentaram diferença significativa quando as células espermáticas foram expostas às diversas osmolaridades das soluções hiposmóticas (Figura 1).



**Figura 1.** Médias ( $\pm$  erro padrão) do número de caudas dobradas (%) em soluções hiposmóticas com diferentes osmolaridades (mOsm/L). Letras distintas indicam diferença significativa entre as soluções, pelo teste de Tuckey ( $P < 0,05$ ).

As populações espermáticas apresentaram elevada porcentagem de CD da solução S1 à S7, atingindo menores valores nas soluções S8 a S10. Essa tendência também foi notada para CFD, diferindo apenas na particularidade de que em S1 os valores não apresentaram distinção de S8, S9 e S10 ( $P > 0,05$ ). A comparação entre CD e CFD foi propositalmente executada para inferência do efeito das diferentes osmolaridades, pois o dobramento intenso da cauda do espermatozoide pode sugerir um defeito morfológico celular prévio<sup>8</sup> e não, de fato, ser consequente à exposição hipo-osmolar. Assim, no presente estudo, com o comportamento semelhante de CD e CFD, pode-se inferir que não houve influência de defeitos morfológicos na análise pretendida. Por conceito, a solução hiposmótica considerada ideal deve ocasionar um estresse osmótico suficientemente grande para causar aumento observável no volume intracelular, mas sem levar à lise da membrana espermática<sup>6</sup>. Isso justifica a notável redução na proporção de células com CD e CFD, observadas nas S8 (250 mOsm/L), S9 (290 mOsm/L) e S10 (300 mOsm/L), permitindo inferir que essas concentrações não são adequadas para execução do HOST em ovinos. Sendo assim, as osmolaridades de 75 a 200 mOsm/L aparentemente apresentaram ser mais eficientes para o teste, o que difere a técnica daquela utilizada para outras espécies, como, caprinos (100 a 200 mOsm/L)<sup>2</sup>, bovinos (150 mOsm/L)<sup>3</sup> e equinos (25 a 100 mOsm/L)<sup>10</sup>. A CD diminuiu significativamente da primeira à quinta coleta de sêmen (Figura 2A) e diferiu entre animais (Figura 2B). Sabe-se que a qualidade seminal está associada à influência da frequência de coletas, além de certas variáveis do ambiente<sup>11</sup>, o que pode ter ocorrido no presente estudo, explicando a queda da CD ao longo das coletas. A influência das características seminais individuais dos animais também são relatadas por outros autores<sup>12</sup>, o que corrobora os achados desse trabalho.



**Figura 2.** A- Médias ( $\pm$  erro padrão) do número de células com caudas dobradas (%) obtidas do agrupamento de todas as soluções hiposmóticas, avaliadas em 5 coletas de sêmen consecutivas. B- Médias ( $\pm$  erro padrão) do número de células com caudas dobradas (%) obtidas do agrupamento de todas as soluções hiposmóticas, avaliadas por animal. Letras distintas indicam diferença significativa, pelo teste de Tuckey ( $P < 0,05$ ).

**Conclusão** - O presente estudo demonstrou que as osmolaridades de 75 a 200 mOsm/L aparentemente foram mais eficientes para uso no HOST em sêmen *in natura* de ovinos.

### Referências Bibliográficas

- [1] EMBRAPA-Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018. Novo Censo Agropecuário mostra crescimento efetivo de caprinos e ovinos do Nordeste. Disponível em: <https://www.embrapa.br/modelo/busca-de-noticias/-/noticia/36365362/novo-censo-agropecuário-mostra-crescimento-de-efetivo-de-caprinos-e-ovinos-no-nordeste>. (Acesso em 10.04. 2019).
- [2] Fonseca JF, Torres CAA, Maffili VV, Borges AM, Santos ADF, Rodrigues MT, Oliveria RFM. The hypoosmotic swelling test in fresh goat spermatozoa. *Anim Reprod* 2005; 2, 139-144.
- [3] Revell SG, Mrode RA. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim Reprod Sci* 1994; 36, 77-86.
- [4] Arruda RP, Silva DF, Affonso FJ, Lemes KM, Jaimes JD, Celeghini ECC, Alonso MA, Carvalho HF, Oliveira LZ, Nascimento J. Métodos de avaliação da morfologia e função espermática: momento atual e desafios futuros. *Ver Bras Reprod Anim* 2011; 35, 145-151.
- [5] Dell'Aqua JA, Papa FO, Zahn FS, Alvarenga MA, Leonardo H. Novo teste osmótico de avaliação da integridade da membrana plasmática de sêmen congelado equino. *Rev Bras Reprod Anim* 2002; 26, 189-191.
- [6] Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LID. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. *J Reprod Fertil* 1984; 70, 219-225.
- [7] Fuse H, Ohta S, Sakamoto M, Kazana T, Katayama T. Hypoosmotic swelling test with a medium of distilled water. *Arch Andrology* 1993; 30,111-116.
- [8] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal (CBRA). 3<sup>rd</sup> ed. Belo Horizonte; 2013.
- [9] Moura ABB, Brandão FZ, Esteves, Novita S, Souza GN, Fonseca JF, Pantoja MHA, Romanello N, Botta D, Giro A, Garcia AR. Differences in the thermal sensitivity and seminal quality of distinct ovine genotypes raised in tropical conditions. *Theriogenology* 2019; 123, 123-131.
- [10] Neild D, Chaves G, Flores M, Mora N, Beconi M, Agüero A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. *Theriogenology* 1999; 51, 721-727.
- [11] Aguirre V, Orihuela A, Vázquez R. Effect of semen collection frequency on seasonal variation in sexual behaviour, testosterone, testicular size and semen characteristics of tropical hair rams (*Ovis aries*). *Trop Anim Health Prod.* 2007; 39(4):271-277.
- [12] Prasad JK, Kumar S, Mohan G, Shanker U, Agarwal SK. Hypo-osmotic swelling tests (HOST) and its response in fresh and freeze-thawed semen. *Indian J Anim Sci* 1999; 69, 766-769.

**Agradecimentos:** À Embrapa Pecuária Sudeste (Projetos Rede BIOTEC #11.13.06.001.04.01.001 e SUPEROV #02.13.06.026.00.06), à CAPES e ao CNPq pelo suporte financeiro.