

EFEITO DA SOLUÇÃO, DA FIXAÇÃO EM FORMOL-SALINA E DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE OS RESULTADOS DO TESTE HIPOSMÓTICO PARA SÊMEN EQUINO CONGELADO

SIDNEY GONÇALVES GONZALEZ ALVES¹, ANTONIO DE LISBOA RIBEIRO FILHO², PAOLA PEREIRA DAS NEVES SNOECK³, MARCOS CHALHOUB², RODRIGO FREITAS BITTENCOURT¹, ANA PAULA MOTA PORTELA¹, ANA KARINE ALMEIDA¹, MARIA IZABEL VAZ DE MELO⁴ E MARC HENRY⁵

-
1. Aluno de pós-graduação, Mestrado em Medicina Veterinária Tropical. Escola de Medicina Veterinária da UFBA. E-mail: alvessgg@yahoo.com.br
 2. Departamento de Patologia e Clínicas, Escola de Medicina Veterinária da UFBA, Salvador, BA.
 3. Curso de Medicina Veterinária, UESC, Ilhéus, BA.
 4. Curso de Medicina Veterinária – PUC Minas/Betim.
 5. Departamento de Clínicas e Cirurgia, Escola de Medicina Veterinária da UFMG.

RESUMO

Este experimento objetivou determinar o melhor protocolo de teste hiposmótico (HO) para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides equinos submetidos à criopreservação. Foram avaliadas três soluções HO (água destilada, frutose 100 mOsmol/L e citrato de sódio 100 mOsmol/L), os tempos de incubação de 0, 15 e 30 minutos dependendo do tipo de solução utilizada e o processo de fixação ou não em formol-salina. Após a descongelação do sêmen foram retiradas alíquotas de sêmen para incubação nas três soluções HO. Decorridos os tempos de incubação (0, 15 e 30 minutos), retirou-se uma alíquota de sêmen para leitura do percentual de

espermatozoides reativos ao teste HO e fixou-se, em formol-salina, o restante da mistura sêmen/solução HO para posterior leitura e comparação entre as leituras fixadas *versus* não fixadas. Não houve diferença ($P>0,05$) entre os tempos de incubação independente da solução HO utilizada. A água destilada apresentou maior percentagem de espermatozoides reativos ao teste no protocolo que não usou a fixação em formol, entretanto apresentou resultado semelhante às amostras incubadas em frutose e citrato de sódio, no protocolo que utilizou a fixação em formol. Não houve diferença ($P>0,05$) na comparação, por solução, da leitura fixada *versus* não fixada.

PALAVRAS-CHAVE: Equino, sêmen congelado, teste hiposmótico .

SUMMARY

EFFECT OF SOLUTION, FIXATION IN FORMOL-SALINE AND TIME OF INCUBATION ON RESULTS OF HIPOSMOTIC TEST FOR FROZEN EQUINE SEMEN

The aim of this work was to evaluate equine sperm membrane integrity using the hypoosmotic swelling test (HOST) and compare different solutions and time of incubation in frozen semen. Twelve semen samples were thawed at 75°C/7". The parameters of total and progressive motility and vigour were evaluated post-thaw. Different solutions were used: distilled water, fructose 100 mOsmol/L and sodium citrate 100 mOsmol/L with different incubation time at 37°C: 0, 15 and 30 minutes and the fixation process or not in formaldehyde. There was not difference ($P>0,05$)

among the times of incubation (0', 15', 30'). The percentage of sperm exhibiting HOST in the distilled water was superior to reactions in fructose and sodium citrate among samples that didn't use the fixation in formaldehyde. In the protocol that used the fixation in formaldehyde the percentage of sperm exhibiting HOST in the distilled water was similar to reactions in fructose and sodium citrate. There was not difference ($P>0,05$) in the comparison of sperm exhibiting HOST among samples that were fixed in formaldehyde *versus* samples that were not fixed.

KEY WORDS: Equine, cryopreserved semen, hypoosmotic swelling test.

INTRODUÇÃO

Dentre todos os aspectos morfológicos estruturais dos espermatozoides, a integridade da membrana plasmática e da membrana acrossomal é de crucial importância para o funcionamento da célula espermática. As membranas são essenciais aos processos de capacitação, reação acrossomal, ligação com a zona pelúcida e de fusão dos gametas. Por isso, as membranas espermáticas são fundamentais no processo de fertilização. Na rotina de avaliação das membranas espermáticas, são mais empregados as colorações com sondas fluorescentes e o teste hiposmótico (HARRISON & VICKERS, 1990; MELO & HENRY, 1999). Essas colorações, no entanto, além de possuírem um custo elevado, requerem o uso de microscópio de fluorescência, o qual nem sempre se encontra disponível nos laboratórios.

A aptidão que a membrana plasmática da cauda do espermatozoide possui em expandir-se na presença de uma solução hiposmótica é um indicativo de que o transporte de água através da membrana está ocorrendo normalmente. Esse transporte pode ser considerado um sinal de integridade e funcionalidade da membrana plasmática, cuja atividade funcional pode ser mais um indicador da habilidade fertilizante do espermatozoide (JEYENDRAN et al., 1984).

O teste hiposmótico (HO) foi primeiramente utilizado na avaliação do sêmen de humanos, utilizando-se uma solução, a 150 mOsmol/L, de citrato de sódio e frutose, demonstrando uma correlação positiva com a motilidade e morfologia espermática (JEYENDRAN et al., 1984). A partir daí passou a ser aplicado nas mais diferentes espécies, como a bovina (CORREA & ZAVOS, 1994); eqüina (YAVETZ et al., 1995); suína (VAZQUEZ et al., 1997); canina (INAMASSU et al., 1999); caprina (FONSECA et al., 2001) e ovina (OBERST et al., 2003), desse modo, apresentando um grande número de estudos *in vitro* e *in vivo* que sugeriram a sua utilidade clínica. De fato, mais estudos têm sido publicados sobre a aplicabilidade do teste HO, do que sobre outros novos indicadores espermáticos.

O protocolo para realização do teste HO proposto por JEYENDRAN et al. (1984) vem sendo adaptado por diversos pesquisadores (CORREA &

ZAVOS, 1994; PINTO & LOBO, 1997; MELO & HENRY, 1999; NIE & WENZEL, 2001; DELL'AQUA JR. et al., 2002; MELO et al., 2003). Trata-se de uso de diferentes soluções hiposmóticas, na osmolaridade dessas soluções, na tecnologia imposta ao sêmen e no tempo de incubação no qual o sêmen é submetido, visando determinar o melhor protocolo de teste HO para as diversas espécies de animais domésticos.

Apesar da relativa simplicidade do teste HO, vários pontos podem ser trabalhados para torná-lo um teste de alta confiabilidade. Pode-se discutir desde qual soluto utilizar e qual a osmolaridade ideal da solução HO, até detalhes como a fixação ou não da amostra obtida e até o número de células a serem contadas (MELO & HENRY, 1999).

O objetivo do presente estudo foi verificar se, para o sêmen eqüino congelado: (1) a utilização da água destilada como solução hiposmótica permite fixação em formol-salina tamponada; (2) as reações hiposmóticas, nas soluções utilizadas, acontecem antes dos trinta minutos de incubação e (3) se existe o efeito da solução hiposmótica, quanto ao percentual de espermatozoides reativos ao teste, quando comparada quanto à fixação ou não em formol-salina tamponada após transcorrer o tempo de incubação.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se doze doses de sêmen congelado, colhidas de dez diferentes garanhões. As doses utilizadas encontravam-se envasadas em palhetas francesas de 0,5 mL, contendo aproximadamente 100×10^6 espermatozoides/mL, estocadas em nitrogênio líquido a -196°C .

Descongelaram-se as doses de sêmen em banho-maria a 75°C por sete segundos, e em seguida a 37°C por trinta segundos. Nos casos em que havia mais de uma palheta do mesmo garanhão as amostras eram misturadas e homogeneizadas, em tubo de ensaio, resultando em um *pool* de sêmen.

Imediatamente após a descongelação foi retirada uma ou mais alíquotas de sêmen para avaliação da motilidade total (MT), da motilidade progressiva (MP) e do vigor espermático (V). Após a realização dessas avaliações, retirou-se uma alíquota

de 200 mL de sêmen, a qual foi adicionada a 300 mL de formol-salina tamponada a 37°C para leitura da morfologia espermática.

O teste hiposmótico foi empregado no ensaio para avaliar a integridade funcional da membrana plasmática dos espermatozoides. Foram testadas três soluções de incubação: água destilada, solução de frutose e citrato de sódio a 100 mOsmol/L. A osmolaridade das soluções de frutose e citrato de sódio foi medida em aparelho de precisão (m OSMETTE TM, Model 5004 Automatic Osmometer – Natick MA – USA) baseado no ponto de congelamento dessas soluções.

As três soluções, acrescidas do sêmen, foram submetidas a diferentes tempos de incubação em banho-maria a 37°C. A leitura foi efetuada após serem decorridos quinze minutos e trinta minutos de incubação, para as três soluções. Fez-se ainda uma leitura imediata para a água destilada, reproduzindo o protocolo de leitura proposto por MELO et al. (2003).

Utilizou-se a água destilada na proporção de 1:9 (20 mL de sêmen em 160 mL de água destilada), alterando-se a proporção sugerida por DELL'AQUA JR. et al. (2002). Para a realização do teste HO mediante a utilização de frutose e citrato de sódio, foi mantida a proporção de 1:11 (50 mL de sêmen em 500 mL de solução).

Após o término dos respectivos tempos de incubação, procedeu-se à retirada de uma alíquota de 5 mL de sêmen/solução HO para leitura do percentual de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico, em preparação úmida entre lâmina e lamínula sob objetiva de imersão, em microscopia de contraste de fase com aumento de mil vezes (Microscópio Olympus BX41). As leituras foram feitas por três observadores diferentes, sendo que cada solução foi lida pelo mesmo observador até o final do ensaio.

Foram contadas cem células (JEYENDRAN et al., 1984) por amostra, incluindo-se os dobramentos de cauda que pudessem ser classificados como patológicos, pois estes seriam descontados quando diminuídos dos dobramentos observados na morfologia espermática. Para tal cálculo foi utilizada a seguinte fórmula: HO (%) = (% de alterações na região da cauda após teste HO) – (% de alterações

na região da cauda antes do teste HO) (MELO & HENRY, 1999).

O volume restante de cada amostra, submetida ao teste hiposmótico, foi fixado em formol-salina tamponada a 37°C (MELO & HENRY, 1999), visando verificar se as porcentagens de espermatozoides reativos ao teste hiposmótico sofreram alteração com esta fixação. O teste hiposmótico realizado mediante a utilização de água destilada foi fixado em 50 mL de formol-salina tamponada, e aqueles realizados mediante a utilização de frutose e citrato de sódio foram fixados em 250 mL de formol-salina tamponada, para posterior leitura em microscopia de contraste de fase, seguindo a mesma metodologia descrita para as amostras que não sofreram fixação em formol.

Para o delineamento experimental utilizaram-se parcelas subdivididas, considerando os tempos de leituras (imediata, 15 minutos e 30 minutos) como subparcela, cujos cálculos de média e desvio padrão foram realizados conforme SAMPAIO (2002). O estudo do percentual de reação dos espermatozoides diante de diferentes soluções hiposmóticas, considerando-se os três tempos de incubação e a fixação ou não em formol salino tamponado, foi feito por meio de análise de variância. As médias obtidas foram comparadas pelos testes de Duncan e de Tukey, com uma probabilidade de 5%. Na análise estatística empregou-se o programa estatístico SPSS (Statistical Package of Social Science) – versão 8.0 (1997).

RESULTADOS

A motilidade total foi a característica seminal que apresentou maior variação – de 18,33% a 71% ($43,3 \pm 14,2$). A motilidade progressiva foi de $38,5 \pm 14,5$, e o vigor espermático apresentou-se praticamente semelhante ($2,6 \pm 0,4$) em todas as doses de sêmen descongeladas.

A leitura da morfologia espermática revelou as seguintes médias: alterações de cabeça ($8,2 \pm 2,7$); gota citoplasmática proximal ($2,7 \pm 3,2$); gota citoplasmática distal ($0,9 \pm 1,1$); peça intermediária ($16,3 \pm 8,5$); somatório das alterações da peça principal e peça terminal ($7,5 \pm 10,6$). A média de espermatozoides classificados como normais foi de $64,4 \pm 12,5$.

Os valores percentuais com seus respectivos desvios padrões, dos espermatozoides reativos ao teste HO sem fixação em formol-salina tamponada, nas três diferentes soluções, estão representados na Tabela 1. Observou-se diferença ($P < 0,05$) entre a solução de água destilada e as outras duas soluções (frutose e citrato de sódio). A média de reação por solução apresentou diferença ($P < 0,05$), sendo a água destilada a solução HO que obteve a maior média de reação. Entretanto não houve diferença ($P > 0,05$) entre os tempos de incubação dentro da mesma solução.

As avaliações realizadas nas amostras fixadas após a incubação nas diferentes soluções hiposmóticas demonstraram diferença ($P < 0,05$) da solução

de citrato de sódio a 100 mOsmol/L quando comparada com a solução de frutose a 100 mOsmol/L (Tabela 2).

Não se observou que o processo de fixação em formol-salina tamponada influi negativamente sobre o percentual de formas reativas ao teste HO durante o ensaio, porém houve uma tendência numérica, embora não significativa ($P > 0,05$), de menor percentual de formas reativas no teste HO que empregou água destilada e leitura imediata após fixação em formol (Tabela 3). Não se registrou diferença ($P > 0,05$) dentro da mesma solução HO, quando analisado o fator fixação \times não fixação em formol-salina após a incubação.

TABELA 1. Leitura do teste HO das amostras não fixadas em formol-salina.

Solução	Leitura imediata	15'	30'	Média
Água destilada	28,1 ± 12,4	27,5 ± 12,1	27,4 ± 11,8	27,7 ^A
Frutose 100 mOsmol/L	-	23,6 ± 10,6	23,0 ± 11,6	23,3 ^B
Citrato de sódio 100 mOsmol/L	-	21,8 ± 11,0	23,5 ± 11,1	22,7 ^B

^{A,B} Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$).

TABELA 2. Leitura do teste HO das amostras fixadas em formol-salina.

Solução	Leitura imediata	15'	30'	Média
Água destilada	18,8 ± 12,1	26,1 ± 13,2	25,8 ± 11,6	24,6 ^{AB}
Frutose 100 mOsmol/L	-	25,8 ± 11,3	28,0 ± 11,3	26,9 ^A
Citrato de sódio 100 mOsmol/L	-	22,4 ± 10,8	22,4 ± 9,3	22,8 ^B

^{A,B} Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$).

TABELA 3. Comparação entre as leituras do teste HO das amostras fixadas e não fixadas em formol.

Solução	Fixado	Não Fixado
Água destilada	24,6 ^{aAB}	27,7 ^{aA}
Frutose 100 mOsmol/L	26,9 ^{aA}	23,3 ^{aB}
Citrato de sódio 100 mOsmol/L	22,8 ^{aB}	22,7 ^{aB}

^{a,b} Médias com letras diferentes na mesma linha diferem significativamente ($P < 0,05$).

^{A,B} Médias com letras diferentes na mesma coluna diferem significativamente ($P < 0,05$).

DISCUSSÃO

Os percentuais médios de espermatozóides reativos ao teste HO, que utilizou protocolo sem fixação em formol-salina tamponada e água destilada, mostrou superioridade quando comparado aos protocolos de HO com soluções de frutose e citrato de sódio a 100 mOsmol/L ($P < 0,05$). Vale notar que outros estudos também já haviam relatado a superioridade da água destilada como solução HO quando comparada a outros solutos (açúcares e eletrólitos) utilizados como soluções hiposmóticas (DELL'AQUAJR. et al., 2002; MELO et al., 2003). Trata-se de resultados que podem indicar a água destilada como solução HO para avaliar a integridade da membrana plasmática do espermatozóide equino, principalmente nos protocolos que não utilizam fixação em formol, em decorrência da sua facilidade de uso e baixo custo.

No protocolo cujas amostras foram fixadas em formol-salina, a frutose a 100 mOsmol/L mostrou superioridade como solução HO quando comparada ao citrato de sódio a 100 mOsmol/L ($P < 0,05$), sendo que a água destilada se comportou de maneira semelhante à frutose e ao citrato de sódio a 100 mOsmol/L ($p > 0,05$). Vale destacar que não se encontrou na literatura consultada a possível explicação para esse resultado contraditório, embora NEILD et al. (1999) tenham relatado maior percentual de células reativas ao teste HO para sêmen equino congelado com a utilização de soluções de açúcares abaixo de 100 mOsmol/L. Entretanto, esses autores não testaram em seu trabalho o uso da água destilada como solução HO, que no presente ensaio, no protocolo que não utilizou fixação em formol, determinou maior percentual de reações do que a frutose. Esse resultado pode ser indicativo de que o teste HO que utiliza como solução a água destilada não deve sofrer fixação em formol-salina, provavelmente porque interfere no resultado obtido depois de decorrido o tempo de armazenamento das amostras. Trata-se, no entanto, de hipótese que deverá ser testada por meio de experimentos que desenvolvam um maior número de repetições ou delineada para responder a essa questão.

A solução de água destilada não influenciou no resultado ($P > 0,05$) quando correlacionados os tem-

pos de incubação. Em experimento semelhante, MELO et al. (2003) observaram diferença ($P < 0,05$) entre a leitura imediata (0 minuto) e as leituras pós-incubação (15' e 30'), sugerindo que mesmo os protocolos que utilizam a água destilada precisam permitir que os espermatozóides fiquem expostos por mais tempo em contato com a solução HO para reagirem com dobramento e enrolamento de cauda. No entanto, no presente ensaio, o tempo de incubação não teve efeito sobre as leituras do percentual de reativos ao teste HO que utiliza a água destilada como solução. Essa diferença observada entre os trabalhos pode ser explicada pela diferente metodologia empregada nos ensaios, principalmente pelas diferentes diluições utilizadas no protocolo do teste HO que emprega como solução a água destilada (DELL'AQUAJR. et al., 2002, MELO et al., 2003). As soluções de frutose 100 mOsmol/L e citrato de sódio 100 mOsmol/L também não diferiram ($P > 0,05$) entre os tempos de incubação (15 e 30 minutos), em ambos os protocolos que utilizam ou não a fixação em formol-salina tamponada. Tais resultados corroboram aqueles encontrados por MELO et al. (2003), em amostras não fixadas em formol, que incluem a sacarose e o cloreto de sódio como soluções hiposmóticas. Isso indica que o teste HO para sêmen equino congelado deve ser realizado preferencialmente com 15 minutos de incubação, pois durante este tempo a maior parte dos espermatozóides com membrana funcionalmente íntegra já reagiu.

Através das leituras realizadas pôde-se observar que a quase totalidade das experimentações que incluem o teste HO como indicador da integridade funcional da membrana plasmática do espermatozóide desenvolve-se sem a fixação da mistura sêmen/solução HO pós-incubação. Entretanto, MELO & HENRY (1999) utilizaram a fixação em formol-salina para o sêmen equino resfriado, além de COTTORELLO (2002) e SNOECK (2003), para o sêmen equino congelado. Esses autores não relataram qualquer interferência desse protocolo sobre os resultados de espermatozóides reativos ao teste.

Não se verificou diferença ($P > 0,05$) entre as médias encontradas, por solução HO, quando comparado o efeito da fixação ou não em formol-salina. Isso sugere que a fixação em formol, como protoco-

lo, pode ser utilizada para posterior leitura do percentual de reação dos espermatozoides ao teste HO, em decorrência da maior praticidade deste e exequibilidade, principalmente em experimentações com um número elevado de amostras para leitura.

Embora o mecanismo de ação do formaldeído diante da unidade celular não esteja totalmente esclarecido, MASON & O'LEARY (1991) observaram que, presente na solução de formol-salina, o formaldeído atua junto aos microtúbulos ligando-se a a e b tubulina, despolimerizando a estrutura tubular e desnaturando as proteínas presentes na membrana plasmática. Essa desnaturação protéica, segundo análises de ZHU et al. (2002), promovem alterações na permeabilidade da membrana que dificultam ou impedem o transporte de água para dentro da célula. Provavelmente seja essa alteração na permeabilidade da membrana plasmática do espermatozoide a justificativa para a não-ocorrência de diferença ($P > 0,05$) nas médias, por solução, dos espermatozoides reativos ao teste HO com ou sem fixação em formol-salina pós-incubação (Tabela 3). Baseando-se nessa hipótese, a reação hiposmótica seria cessada quando fixada em formol-salina.

CONCLUSÕES

Comparada com as soluções de frutose e citrato de sódio 100 mOsmol/L, quando a leitura se dá imediatamente depois de decorrido o tempo de incubação, a água demonstrou ser a melhor solução hiposmótica ($P < 0,05$). Entretanto, quando a leitura ocorre após a fixação em formol-salina, a água destilada mostrou-se semelhante ($P > 0,05$) à solução de frutose e citrato de sódio 100 mOsmol/L, podendo, também neste caso, ser utilizada como solução hiposmótica de escolha.

O tempo de incubação de quinze minutos foi suficiente para que ocorressem as reações hiposmóticas, em quase sua totalidade. Como não houve diferença estatística entre os tempos de incubação testados, considerou-se desnecessária a incubação por trinta minutos.

No presente experimento não se registrou diferença ($P > 0,05$) entre as médias, por solução, de espermatozoides reativos ao teste HO, quando comparadas quanto à fixação ou não em formol-salina tamponada após transcorrer o tempo de incubação.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro, e à CAPES, pela bolsa de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

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, p. 351-360, 1994.

COTTORELLO, A. C. P. **Criopreservação de sêmen equino utilizando associação de etilenoglicol e glicerol**. 2002. 47 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

DELL'AQUA 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.

FONSECA, J. F.; TORRES, C. A. A.; SANTOS, A. D. F.; 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. 436-438, 2001.

HARRISON, R. A. P.; VICKERS, S. E. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 88, p. 343-352, 1990.

INAMASSU, A.; UECHI, E.; LOPES, M.D. Viabilização do teste hipo-osmótico em cães e sua relação com outras variáveis espermáticas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n. 3, p. 302-303, 1999.

JEYENDRAN, R.S.; VAN DER VEN, H.H.; PEREZ-PELAEZ, M.; CRABO, B.G.;

ZANEVELD, L.J.D. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 70, p. 219-228, 1984.

MASON, J. T.; O'LEARY, T. J. Effects of formaldehyde fixation on protein secondary structure: a calorimetric and infrared spectroscopic investigation. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 39, n. 2 p. 225-229, 1991.

MELO, M.I.V.; HENRY, M. Teste hiposmótico na avaliação do sêmen equino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 51, n. 1, p. 71-78, 1999.

MELO, M.I.V.; SNOECK, P.P.N.; BISPO, C.; HENRY, M. Efeito da solução e do tempo de incubação sobre os resultados do teste hiposmótico para o sêmen equino congelado. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 3, p. 379-380, 2003.

NEILD, D.; CHAVES, G.; FLORES, M.; MORA, N.; BECONI, M.; AGÜERO, A. Hypoosmotic test in equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 51, p. 721-727, 1999.

NIE, G. J.; WENZEL, J. G. W. Adaptation of the hypoosmotic swelling test to assess functional integrity of stallion spermatozoal plasma membranes. **Theriogenology**, v. 55, p. 1005-1018, 2001.

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 da avaliação da integridade da membrana espermática do carneiro. **Revista**

Brasileira de Reprodução Animal, v. 27, n. 3, p. 375-376, 2003.

PINTO, N. F.; LOBO, R. N. B. Utilização do teste hiposmótico para determinação da integridade da membrana plasmática do sêmen equino a fresco e resfriado por diferentes períodos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 3, p. 133-135, 1997.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 265p.

SNOECK, P.P.N. **Aspectos da criopreservação de sêmen equino**: composição do meio diluidor, curvas de congelação e fertilidade. 2003. 116 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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

YAVETZ, H.; HAUSER, R.; YOGEV, L.; BOTCHAN, A.; LESSING, Z.; HOMONNAI, T.; PAZ, G. Advanced methods for evaluation of sperm quality. **Andrologia**, v. 27, p. 31-35, 1995.

ZHU, F.; TAJKHORSHID, E.; SCHULTEN, K. Pressure-induced water transport in membrane channels studied by molecular dynamics. **Biophysical Journal**, v. 83, p. 154-160, 2002.