

USO DE DIFERENTES ÍONS DE CÁLCIO ADICIONADOS AO DILUENTE DE SÊMEN SUÍNO RESFRIADO

(Use of different calcium ions added in the extender of swine cooled semen)

Ricardo Toniolli^{1*}; Daianny Barbosa Guimarães²; Luciana de Souza Toniolli¹;
Tatyane Bandeira Barros²; Aline Viana Dias²; Ludymila Furtado Cantanhêde²

¹Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS - LabSuis), FAVET/UECE; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), FAVET/UECE. Av. Dr. Silas Munguba, 1700. Campus Itaperi, Fortaleza, Ceará, Brasil. CEP: 60.740-000.

RESUMO

Estudos mostram que o íon cálcio é muito importante para regulação da motilidade espermática. Assim, objetivou-se avaliar a qualidade dos espermatozoides suínos resfriados sob o efeito de diferentes tipos e concentrações de íons cálcio no diluente BTS. O sêmen de varrões foi coletado e analisado, quanto aos seus parâmetros. O experimento contou com a utilização de diferentes tipos de cálcio, diluídos em BTS: Carbonato de cálcio, Hidróxido de cálcio, Fosfato dibásico anidro de cálcio, Sulfato hidratado de cálcio e Sulfato anidro de cálcio, adicionados ao diluente BTS em diferentes concentrações: 0 mM (controle); 0,4mM; 4mM; 40mM e 400mM. Após a coleta e avaliação seminal, as amostras foram diluídas e armazenadas a 17 °C. Para a avaliação do efeito do cálcio, foi retirado uma alíquota de cada amostra, submetida à temperatura de 37 °C para a avaliação do vigor, motilidade e vitalidade espermática, realizadas no D0, D2 e D4. A adição dos sais de cálcio permite hiperativação aos espermatozoides quanto à membrana espermática e a membrana acrossômica, estes sais, em seus níveis já mencionados, não exerceram efeito negativo.

Palavras-chave: Espermatozoide, cálcio, motilidade, sêmen suíno.

ABSTRACT

Studies show that calcium ion is very important for the regulation of sperm motility. Thus the objective was to assess the quality of sperm swine flu under the effect of different types and concentrations of calcium ions in the BTS. The semen of boars was collected and analyzed for their parameters. The experiment included the use of different types of calcium diluted in BTS: calcium carbonate, calcium hydroxide, calcium phosphate dibasic anhydrous, hydrated calcium sulphate, anhydrous calcium sulphate, added to the BTS extender in different concentrations: 0 mM (control); 0.4 mM; 4 mM; 40mm and 400 mM. After collecting and seminal review, the samples were diluted and stored at 17 °C. To evaluate the effect of calcium was removed from an aliquot of each sample, which was subjected to a temperature of 37 °C for vigor, vitality and sperm motility, performed on D0, D2 and D4. The addition of calcium salts provides the sperm hyperactivation, and as a

*Endereço para correspondência:
ricardo.toniolli@uece.br

sperm membrane and acrosome membrane, these salts in their levels mentioned above did not exert a negative effect.

Keywords: Sperm, calcium, motility, boar semen.

INTRODUÇÃO

O cálcio encontra-se envolvido em processos fisiológicos de excitação, crescimento, locomoção celular, estabilidade da membrana plasmática, comunicação intercelular, fusão de membranas, processos de transportes intracelulares e fertilização (GILMAN *et al.*, 1991). Alguns estudos colocaram em evidência que, a inclusão de ions Ca^{2+} nos diluentes de sêmen, tem um papel especial na regulação da motilidade espermática de vertebrados, com alguns resultados sugerindo que o cálcio extracelular é indispensável à ativação da motilidade espermática (YOSHIDA *et al.*, 1994). Em mamíferos, o Ca^{2+} extracelular regula a fertilização, por meio de sua participação em diversos eventos, incluindo hiperativação da motilidade espermática, reação acrossômica, fusão espermatozoide-oócito, ativação do oócito (SUAREZ *et al.*, 1993) e no processo de capacitação (MARQUES *et al.*, 2007).

Em reprodutores suínos, as modificações da permeabilidade de membrana espermática a diferentes ions e, em particular, ao cálcio, durante a capacitação, seriam responsáveis pela mudança da motilidade dos espermatozoides (DARSZON *et al.*, 1999). Nessa situação, o aumento dos níveis de milimolar desse ion extracelular, são requeridos para desencadear dois processos que precedem à fertilização (SUAREZ *et al.*, 1993).

A motilidade hiperativada é definida como o padrão de movimento flagelar apresentado pelo espermatozoide no sítio de fertilização; onde, dependendo da espécie animal, pode ser estimulada por hormônios, ions e secreções do fluido luminal do oviducto (YANAGIMACHI, 1994). O Ca^{2+} extracelular é requerido para a manutenção da hiperativação em espermatozoides de camundongos (YANAGIMACHI, 1982), o que permite, *in vitro*, uma efetiva penetração na zona pelúcida, em relação aos não hiperativados (STAUSS *et al.*, 1995), graças a uma maior concentração desse ion dentro do flagelo de espermatozoides hiperativados (SUAREZ *et al.*, 1993). Assim, pode-se observar que o ion Ca^{2+} tem mostrado sua importante participação na iniciação e manutenção da motilidade hiperativada (HO; SUAREZ, 2001).

A adição de cálcio ao diluente de sêmen poderia aumentar a capacidade de fertilização dos espermatozoides, em fertilização *in vitro*, bem como em programas de inseminação artificial. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações dos ions cálcio, adicionados ao diluente do sêmen suíno, visando obter uma melhoria da qualidade dos espermatozoides do varrão.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local, coleta e avaliação do sêmen *in natura*

Foram utilizados reprodutores híbridos, pertencentes ao Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen, da Faculdade de Veterinária, na Universidade Estadual do Ceará. Os animais tinham idades entre 12 e 24 meses, e se encontravam em sistema rotineiro de coletas de sêmen, sendo mantidos sob o mesmo regime de estabulação e manejo alimentar (2 kg de ração/dia, com 14% de proteína bruta, 2900 Kcal e premix mineral). Antes de cada coleta, era realizada uma higienização externa do prepúcio, com sabão neutro e água tratada, seguido de esgotamento prepucial por pressão manual e secagem da região, com papel toalha descartável.

O sêmen de cinco reprodutores suínos foi coletado, uma vez por semana, durante oito semanas consecutivas ($n = 40$), por meio da técnica da mão enluvada, em becker plástico, com capacidade de 600 mL, coberto por gaze descartável e protegido em copo térmico de coleta. Foi utilizado o ejaculado total de cada reprodutor, após separação e descarte da parte gelatinosa, por meio de filtro próprio. Em seguida à coleta, o ejaculado era levado ao laboratório e avaliado quanto à temperatura ($^{\circ}\text{C}$); concentração ($\times 10^6$ spz/mL em espectrofotômetro); volume (mL em balança digital) e índice total de espermatozoides ($\times 10^9$ spz). Para o exame do vigor espermático (0 a 5) e da motilidade espermática (% de células móveis – MARTIN RILLO, 1996), o ejaculado era avaliado, através de uma amostra de sêmen (15 μL), colocada entre lâmina e laminula e levada ao microscópio óptico em um aumento de 200 vezes. Esses exames serviram para a avaliação e controle da qualidade de cada ejaculado, durante o período experimental, sendo aproveitados apenas aqueles com valores mínimos de vigor $\geq 3,0$ e de motilidade $\geq 70\%$.

Diluição do sêmen, diferentes tipos e concentrações do íon cálcio

Foram testadas, individualmente, cinco formas químicas/moleculares do cálcio, adicionadas ao diluente *Betsville Thawing Solution* (BTS); sendo, cada uma delas, avaliada em quatro diferentes concentrações. O ejaculado de cada reprodutor foi repartido igualmente entre os diferentes tratamentos, a uma concentração de 35×10^6 spz/mL. O volume final para cada tratamento (15 mL = sêmen + diluente) foi repartido em tubos de ensaio, com capacidade para 5 mL, num total de 3 tubos/tratamento/ejaculado (1 tubo/dia de análise). De acordo com a concentração de cada ejaculado, volumes diferentes de diluente foram utilizados, a fim de completar o volume final de cada tratamento. Cada tubo de ensaio teve um total de 105×10^6 spz.

Foi separado, de cada ejaculado, um total de $4,725 \times 10^9$ spz, divididos por todos os tratamentos, em três tubos de ensaio/tratamento (3 mL/tubo). Após a coleta do ejaculado, foi colocado em banho maria a 30°C , durante 15 minutos; ao final dos quais, foi diluído em BTS, repartido nos tubos de ensaio (por tratamento), fechado com tampa plástica e, em seguida, colocado em conservadora de sêmen à temperatura entre de 15 a 17°C , durante 5 dias. O dia de coleta foi considerado dia zero (D0) e o sêmen conservado até 4 dias após a coleta (D4), com análises em três dias diferentes: no primeiro (D0); no terceiro (D2) e no último (D4) dia de conservação. Em cada dia de análise, foram retirados os tubos equivalentes de cada ejaculado por tratamento e incubados em banho-maria, a 37°C , por 10 minutos, sendo feita avaliação seminal das características de vigor espermático, motilidade espermática e total de espermatozoides vivos.

Diferentes concentrações de cálcio (mM/mL) foram testadas e adicionadas ao diluente BTS: 0,0; 0,4mM/mL; 4mM/mL; 40mM/mL e 400mM/mL, proporcionando a formação dos diferentes tratamentos experimentais, conforme a seguir: **T1** = BTS (Controle); **T2** = BTS + Carbonato de cálcio (CaCO_3); **T3** = BTS + Fosfato dibásico anidro de cálcio (CaHPO_4); **T4** = BTS + Hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$]; **T5** = BTS + Sulfato diidratado de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); **T6** = BTS + Sulfato anidro de cálcio (CaSO_4).

Obs.: Os tratamentos de T2 a T6, na sua formação, estão subdivididos nas quatro diferentes concentrações acima colocadas, para cada íon cálcio testado.

Avaliação do sêmen diluído e conservado

Vigor e motilidade espermática

Para as características vigor espermático (0 a 5 - TONIOLLI, 1996) e motilidade espermática (0 a 100% - MARTIN RILLO, 1996), foi retirada uma alíquota (15 μL) do sêmen conservado e reaquecido a 37 °C, durante 10 minutos, colocada entre lâmina e laminula e analisada em microscopia óptica, com aumento de 200x. Foram avaliados três diferentes campos no microscópio, com análises sendo feitas em diferentes dias de conservação.

Avaliação da Vitalidade Espermática

As amostras de sêmen foram preparadas para os esfregaços, em D0, D2 e D4, sempre após 10 minutos de reaquecimento do sêmen, a 37 °C. Os exames de vitalidade espermática (% de células vivas) foram feitos, através de um esfregaço de sêmen, corado pela solução de azul de bromo-fenol (0,1 g; citrato de sódio = 0,4 g; água destilada = 10 mL), com osmolaridade da solução, variando entre 300 e 310 mOsm e analisados por microscopia óptica, com lente de imersão, sob um aumento de 1000x, conforme explicado a seguir: juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante (30 μL) e homogenizou-se. Após 30 segundos, foi retirada dessa mistura uma gota (20 μL), para se preparar o esfregaço, que ficou secando à temperatura ambiente. Para análises dos resultados, as células coradas foram consideradas mortas e as células não coradas como vivas. Foram contadas 200 células por esfregaço.

Análise estatística

O delineamento experimental utilizado foi o de Blocos ao Acaso. A análise estatística foi feita por meio da avaliação das médias e erros padrões, aos quais foram aplicados testes de análise de variância. Primeiramente, aplicou-se GLM (Modelo Linear Geral), uma análise variância multifatorial e, posteriormente, o teste de Tukey e o teste do Qui-quadrado, corrigido para comparações entre os dias de análises dos tratamentos; bem como entre tratamentos. Utilizou-se o programa de estatística Systat 7.0. Considerou-se diferença estatística significativa quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliação do sêmen *in natura*

Os ejaculados *in natura* analisados no experimento apresentaram aspecto normal, coloração branca leitosa, volume médio de 255,5±21mL; concentração média de 297,0±23 x10⁶ spz/mL; total de células de 75,1±8,8 x10⁹ spz, estando tais características dentro da normalidade para a espécie suína (CORRÊA *et al.*, 2001; SMITAL, 2009). O sêmen de todos os ejaculados apresentou uma motilidade média de 91,0±1,0% e vigor espermático médio de 4,1±0,1, encontrando-se, desta forma, dentro dos padrões mínimos estipulados pelo protocolo para serem utilizados no experimento.

Avaliação do sêmen diluído e conservado

Motilidade e vigor espermático

Os valores médios de vigor e motilidade espermática das amostras que receberam diferentes concentrações de carbonato de cálcio (CaCO₃) e hidróxido de cálcio (Ca(OH)₂), estão representados na Tab. 1 e 2, respectivamente. As amostras que receberam as maiores concentrações de CaCO₃ e Ca(OH)₂ (40 e 400mM) tiveram valores de motilidade e vigor significativamente menores (p<0,05) que as demais concentrações, nas análises efetuadas em D0 e D2. Verificou-se que altas concentrações desses sais no meio extracelular teve efeito negativo sobre o vigor e a motilidade espermática; enquanto, no D4, não houve diferenças significativas entre as concentrações de Ca²⁺. As amostras que receberam 0,4 e 4mM de CaCO₃ e Ca(OH)₂ não diferiram, significativamente, do controle nos D0 e D4; entretanto, no D2, seus valores foram significativamente menores para vigor e motilidade, ressaltando-se que os valores de vigor dessas amostras apresentaram movimentos circulares e desorganizados (TONIOLLI, 1996), características essas que podem estar relacionadas com um processo de hiperativação. Observou-se, também, que em cada concentração de cálcio [CaCO₃ e Ca(OH)₂] houve uma redução progressiva, tanto para a motilidade, quanto para o vigor espermático, ao longo dos tempos de análise (D0, D2 e D4).

Tabela 1. Valores de vigor e motilidade espermática (média±DP) do sêmen suíno, conservado a 17 °C, durante 5 dias, diluído em BTS, adicionado de diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio.

Trat.	Ca ²⁺ (mM)	Vigor Espermático			Motilidade Espermática		
		D0	D2	D4	D0	D2	D4
BTS	0	3,1±0,3 ^{aA}	2,1±0,2 ^{bA}	0,1±0,1 ^{cA}	60,5±4,0 ^{aA}	45,0±6,3 ^{bA}	4,0±2,7 ^{cA}
	0,4	2,3±0,2 ^{aA}	1,1±0,2 ^{bb}	0,4±0,1 ^{bA}	49,5±4,5 ^{aA}	33,5±4,0 ^{abB}	11,0±4,8 ^{bA}
CaCO ₃	4	2,4±0,3 ^{aA}	0,9±0,1 ^{bb}	0,3±0,1 ^{bA}	58,5±5,1 ^{aA}	27,5±4,6 ^{bb}	10,0±3,6 ^{bA}
	40	1,3±0,1 ^{ab}	0,5±0,1 ^{bc}	0,0±0,0 ^{bA}	31,5±4,4 ^{ab}	2,0±2,0 ^{bc}	0,0±0,0 ^{bA}
	400	0,8±0,2 ^{ab}	0,0±0,0 ^{bc}	0,0±0,0 ^{bA}	22,5±5,0 ^{ab}	0,0±0,0 ^{bc}	0,0±0,0 ^{bA}

aA,bb,Cc: letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas, na mesma coluna, indicam diferenças significativas (p<0,05).

As amostras que receberam as maiores concentrações de íons cálcio, tanto de Carbonato, quanto de Hidróxido de Cálcio, apresentaram resultados significativamente menores, devido ao fato de que altas concentrações deste íon podem ter levado a um

desequilíbrio iônico na célula; pois, esta substância, além de regular numerosos fenômenos celulares fisiológicos, pode também desencadear e participar de eventos patológicos que levam à injúria celular (BOOTMAN *et al.*, 2001), já que o mecanismo de mobilização do cálcio é contido por canais seletivos. O controle preciso das concentrações de cálcio são importantes para manter níveis intracelulares baixos e constantes deste íon, pois o cálcio fora de controle é letal à célula (ALBERTS *et al.*, 2002).

Tabela 2. Valores de vigor e motilidade espermática (média±DP) do sêmen suíno, conservado a 17 °C, durante 5 dias, diluído em BTS, adicionado de diferentes concentrações de Hidróxido de Cálcio.

Trat.	Ca ²⁺ (mM)	Vigor Espermático			Motilidade Espermática		
		D0	D2	D4	D0	D2	D4
BTS	0	3,1±0,3 ^{aA}	2,1±0,2 ^{bA}	0,1±0,1 ^{cA}	60,5±4,0 ^{aA}	45,0±6,3 ^{bA}	4,0±2,7 ^{cA}
	0,4	2,3±0,3 ^{aA}	0,9±0,2 ^{bB}	0,4±0,2 ^{bA}	54,5±6,1 ^{aA}	27,0±4,5 ^{bB}	12,5±5,4 ^{bA}
Ca(OH) ₂	4	2,5±0,2 ^{aA}	1,4±0,1 ^{bB}	0,5±0,2 ^{bA}	52,0±4,6 ^{aA}	26,0±4,0 ^{bB}	10,5±5,3 ^{bA}
	40	0,1±0,1 ^{ab}	0,0±0,0 ^{cC}	0,0±0,0 ^{aA}	1,0±1,0 ^{ab}	0,0±0,0 ^{cC}	0,0±0,0 ^{aA}
	400	0,1±0,1 ^{ab}	0,0±0,0 ^{cC}	0,0±0,0 ^{aA}	1,0±1,0 ^{ab}	0,0±0,0 ^{cC}	0,0±0,0 ^{aA}

aA,bB,cC: Letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna evidenciam diferenças significativas ($p < 0,05$).

No entanto, tais resultados diferiram daqueles obtidos por Toniolli e Combarous (1999), que utilizaram concentrações diferentes de CaCl₂ e observaram que concentrações de 4,1 e 41mM desse sal promoviam um maior aumento da motilidade, quando comparado ao das concentrações de 0,041e 0,41Mm; isto, até o terceiro dia de conservação do sêmen, a 17 °C. A partir do quarto dia, as diferenças foram maiores e com efeito significativamente favoráveis à concentração de 4,1mM de CaCl₂, levando-se a entender que altas concentrações desse sal no meio extracelular, a longo prazo, tem um efeito negativo sobre a motilidade espermática. Também se pode pensar que o cálcio restante no meio extracelular provoque um desequilíbrio nocivo à membrana dos espermatozoides. Em outros estudos, foi observado que concentrações de 5,0 e 7,5 mM de CaCl₂ influenciaram a motilidade espermática, mantendo maiores frequências de motilidade na escala entre 60 - 90% (LIMA, 2006).

Os resultados de vigor e motilidade espermática, obtidos pela adição de diferentes concentrações de fosfato dibásico anidro de cálcio [CaHPO₄], sulfato diidratado de cálcio [CaSO₄.2H₂O] e sulfato anidro de cálcio [CaSO₄] estão apresentados abaixo, nas Tabs. 3, 4 e 5, respectivamente. No terceiro dia (D2) de conservação do sêmen, as amostras que receberam 0,4; 4; 40 e 400mM destes íons tiveram valores de motilidade e vigor significativamente menores ($p < 0,05$) que o tratamento controle. Para estas mesmas características, nas análises em D0 e D4, não houve diferenças significativas entre as diferentes concentrações de fosfato dibásico anidro de cálcio, sulfato diidratado de cálcio e sulfato anidro de cálcio. Também, deve ser levado em consideração, que os valores médios do vigor espermático dessas amostras, com diferentes concentrações de CaHPO₄, CaSO₄.2H₂O e CaSO₄ apresentaram movimentos circulares/retilíneos, com oscilações do flagelo mais vigorosas (TONIOLLI, 1996) do que as encontradas nas amostras de CaCO₃ e Ca(OH)₂, o que pode estar relacionado, também, ao processo de hiperativação espermática.

Desta maneira, teria sido interessante, se estas mesmas amostras tivessem sido avaliadas por meio de um sistema de análise computadorizada, para determinação da hiperativação. Nas amostras com as diferentes concentrações de cálcio [CaHPO₄, CaSO₄.2H₂O e CaSO₄], houve uma redução progressiva, tanto para a motilidade, quanto para o vigor espermático, ao longo do período de conservação do sêmen (D0 a D4).

Tabela 3. Valores do vigor e da motilidade espermática (média±DP) do sêmen suíno, conservado a 17 °C, durante 5 dias, diluído em BTS, adicionado de diferentes concentrações de Fosfato dibásico anidro de cálcio.

Trat.	Ca ²⁺ (mM)	Vigor Espermático			Motilidade Espermática		
		D0	D2	D4	D0	D2	D4
BTS	0	3,1±0,3 ^{aA}	2,1±0,2 ^{bA}	0,1±0,1 ^{cA}	60,5±4,0 ^{aA}	45,0±6,3 ^{bA}	4,0±2,7 ^{cA}
	0,4	2,4±0,2 ^{aA}	1,0±0,2 ^{bB}	0,3±0,1 ^{bA}	58,0±4,4 ^{aA}	29,0±2,6 ^{bB}	8,0±3,6 ^{cA}
CaHPO ₄	4	2,2±0,3 ^{aA}	0,7±0,1 ^{bB}	0,3±0,1 ^{bA}	58,5±5,3 ^{aA}	22,5±3,6 ^{bB}	7,0±4,0 ^{bA}
	40	2,3±0,3 ^{aA}	1,4±0,3 ^{abB}	0,5±0,2 ^{bA}	56,0±5,5 ^{aA}	30,5±5,7 ^{abB}	10,5±5,0 ^{bA}
	400	2,1±0,2 ^{aA}	1,0±0,2 ^{bcB}	0,3±0,1 ^{cA}	52,5±3,8 ^{aA}	28,0±5,3 ^{bcB}	9,0±4,0 ^{cA}

aA,bb,Cc: letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna expõem diferenças significativas (p<0,05).

Atualmente, pouco se sabe sobre a regulação bioquímica da motilidade hiperativada. Tem-se demonstrado que o cálcio extracelular é requerido, para manter a hiperativação *in vitro* (FRASER, 1987) e tem sido comprovada que a concentração de cálcio livre no meio intracelular é maior no espermatozoide hiperativado, do que no ativado. Em espermatozoides de touro, a motilidade ativada pode ser facilmente distinguida da motilidade hiperativada. No primeiro caso, o movimento espermático é caracterizado pelo batimento simétrico do flagelo, o que resulta em uma trajetória linear e, no segundo caso, a motilidade espermática é caracterizada pelo batimento flagelar assimétrico, que produz padrões de movimentos circulares ou em figura de oito (MARQUEZ; SUAREZ, 2004).

Tabela 4. Valores do vigor e da motilidade espermática (média±DP) do sêmen suíno, conservado a 17 °C, durante 5 dias, diluído em BTS, adicionado de diferentes concentrações de Sulfato diidratado de cálcio.

Trat.	Ca ²⁺ (mM)	Vigor Espermático			Motilidade Espermática		
		D0	D2	D4	D0	D2	D4
BTS	0	3,1±0,3 ^{aA}	2,1±0,2 ^{bA}	0,1±0,1 ^{cA}	60,5±4,0 ^{aA}	45,0±6,3 ^{bA}	4,0±2,7 ^{cA}
	0,4	2,4±0,2 ^{aA}	1,5±0,1 ^{bB}	0,3±0,1 ^{cA}	56,5±4,5 ^{aA}	41,0±4,5 ^{bA}	10,0±4,2 ^{cA}
CaSO ₄ . 2H ₂ O	4	2,6±0,2 ^{aA}	1,4±0,3 ^{bB}	0,5±0,1 ^{cA}	61,5±4,5 ^{aA}	36,5±5,7 ^{bA}	14,0±4,0 ^{cA}
	40	2,1±0,3 ^{aA}	1,0±0,2 ^{bB}	0,3±0,1 ^{bA}	52,5±7,0 ^{aA}	32,5±5,4 ^{bA}	18,0±4,2 ^{bA}
	400	2,3±0,3 ^{aA}	1,2±0,2 ^{bB}	0,4±0,1 ^{cA}	54,5±4,8 ^{aA}	32,5±5,6 ^{bA}	10,0±4,0 ^{cA}

aA,bb,Cc: letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna mostram diferenças significativas (p<0,05).

Alguns estudos já foram realizados, utilizando-se o cloreto de cálcio [CaCl₂], adicionado ao diluente de sêmen, em concentrações variadas, por exemplo, 2,5; 5,0 e 7,5mM em espermatozoides de suínos (LIMA, 2006) e 1 mM em espermatozoides de camundongos (NAKAMURA *et al.*, 1993); 11mM em espermatozoides de ascidia

(YOSHIDA *et al.*, 2003); 0,22; 0,5; 1,5 e 2,5mM em espermatozoides do homem (MARIN-BRIGGILER *et al.*, 2003). A escolha desse sal foi muitas vezes justificada, por ele apresentar boa estabilidade e não precipitar no meio de diluição (LIMA, 2006). Pesquisas utilizando o hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂], adicionado ao meio com células espermáticas de camundongos, em concentrações que variaram de 0,5; 2 e 10mM, mostraram que o aumento gradual da concentração de cálcio extracelular está associado, também, a um aumento da concentração intracelular desse ion (KIRICHOK *et al.*, 2006).

Tabela 5. Valores do vigor e da motilidade espermática (média±DP) do sêmen suino, conservado a 17 °C, durante 5 dias, diluído em BTS, adicionado de diferentes concentrações de Sulfato anidro de cálcio.

Trat.	Ca ²⁺ (mM)	Vigor Espermático			Motilidade Espermática		
		D0	D2	D4	D0	D2	D4
BTS	0	3,1±0,3 ^{aA}	2,1±0,2 ^{bA}	0,1±0,1 ^{cA}	60,5±4,0 ^{aA}	45,0±6,3 ^{bA}	4,0±2,7 ^{cA}
	0,4	2,2±0,3 ^{aA}	1,0±0,3 ^{bB}	0,4±0,1 ^{bA}	54,0±5,3 ^{aA}	29,0±4,6 ^{bB}	12,0±4,4 ^{bA}
CaSO ₄	4	2,3±0,2 ^{aA}	1,3±0,3 ^{bB}	0,2±0,1 ^{cA}	56,5±3,8 ^{aA}	33,5±1,2 ^{bB}	7,0±3,0 ^{cA}
	40	2,5±0,2 ^{aA}	1,2±0,2 ^{bB}	0,2±0,1 ^{cA}	59,0±4,1 ^{aA}	33,5±5,0 ^{bB}	6,0±3,4 ^{cA}
	400	2,8±0,2 ^{aA}	1,2±0,2 ^{bB}	0,1±0,1 ^{cA}	63,0±3,6 ^{aA}	25,0±5,3 ^{bB}	2,0±1,3 ^{cA}

aA,bB,Cc: letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p<0,05).

O mecanismo de aumento do cálcio intracelular em espermatozoides envolve a abertura de canais de cálcio na membrana plasmática, porque a hiperativação é interrompida quando esses canais são bloqueados por antagonistas (STAUSS *et al.*, 1995).

O cálcio intracelular no espermatozoide tem um papel fundamental nos processos de capacitação, hiperatividade e reação acrossomal para a fertilização. Além disso, o cálcio intra celular é o principal elemento para a motilidade flagelar e fusão da vesícula acrossomal (DARSZON *et al.*, 1999). O aumento de cálcio interno é um passo essencial na via de sinalização da ZP3 (uma das três glicoproteínas da zona pelúcida), levando à reação acrossomal; sendo o cálcio extracelular muito importante para este processo fisiológico (DARSZON *et al.*, 1996).

Dessa forma, o ion cálcio tem um papel regulador no controle da motilidade e do metabolismo energético do espermatozoide (DARZON *et al.*, 1999). A motilidade espermática é um bom indicador da fertilidade espermática em suínos e apresenta alta correlação com a taxa de penetração em oócitos, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (GADAE, 2005). A avaliação da motilidade espermática por períodos prolongados é importante e deve merecer atenção especial (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

Avaliação da Viabilidade Espermática

Os valores médios do total de espermatozoides vivos das amostras analisadas, que receberam diferentes concentrações de carbonato de cálcio, hidróxido de cálcio, fosfato dibásico anidro de cálcio, sulfato hidratado de cálcio e sulfato anidro de cálcio e foram conservados por 5 dias a 17 °C e D4, estão representados na Tab. 6.

Dentre todas as amostras testadas no presente experimento, não houve diferença significativa para os valores de espermatozoides vivos e mortos no D0 e D4, exceto as

amostras que receberam as maiores concentrações de CaCO_3 e Ca(OH)_2 (40 e 400mM), que obtiveram valores de espermatozoides vivos significativamente menores ($p<0,05$) que as demais amostras, nas análises do D0. Todos estes valores de D0 são significativamente maiores do que os valores observados no D4, mostrando que a vitalidade do espermatozoide cai de forma gradativa, ao longo dos dias de conservação.

Já, quanto ao fosfato dibásico anidro de cálcio, sulfato diidratado de cálcio e sulfato anidro de cálcio, embora tenham exercido efeito sobre o vigor e motilidade espermática no segundo dia de análise (D2), estes não foram capazes de alterar a porcentagem de espermatozoides vivos.

Tabela 6. Total de espermatozoides vivos (%) (média±DP) do sêmen suíno, conservado a 17 °C, durante 5 dias, diluído em BTS, adicionado de diferentes tipos e concentrações de íon cálcio.

Tratamentos	Ca ²⁺ (mM)	Total sptz vivos		
		D0	D2	D4
BTS	0	56,5±5,0 ^{aA}	60,5±5,0 ^{aA}	34,0±4,0 ^{bA}
CaCO ₃	0,4	62,0±3,0 ^{aA}	60,5±3,0 ^{aA}	32,5±5,0 ^{bA}
	4	60,5±4,5 ^{aA}	60,5±4,0 ^{aA}	33,5±4,5 ^{bA}
	40	42,5±4,0 ^{ab}	42,0±3,0 ^{ab}	22,5±4,5 ^{bA}
	400	42,5±4,0 ^{ab}	43,0±3,0 ^{ab}	24,0±4,5 ^{bA}
Ca(OH) ₂	0,4	56,5±5,0 ^{aA}	64,5±4,5 ^{aA}	33,0±3,5 ^{bA}
	4	58,0±5,0 ^{aA}	60,0±3,5 ^{aA}	37,0±4,0 ^{bA}
	40	34,0±6,0 ^{ab}	30,5±7,0 ^{ab}	25,0±3,0 ^{bA}
	400	35,0±6,0 ^{ab}	32,5±7,0 ^{ab}	25,0±4,0 ^{bA}
CaHPO ₄	0,4	58,5±4,5 ^{aA}	64,0±3,0 ^{aA}	41,0±3,0 ^{bA}
	4	56,5±5,0 ^{aA}	60,0±5,0 ^{aA}	38,0±3,0 ^{bA}
	40	56,0±6,0 ^{aA}	60,0±6,0 ^{aA}	35,5±3,0 ^{bA}
	400	53,5±5,0 ^{aA}	60,0±4,0 ^{aA}	31,0±3,0 ^{bA}
CaSO ₄ H ₂ O	0,4	54,0±5,0 ^{aA}	58,5±5,0 ^{aA}	32,0±4,0 ^{bA}
	4	58,5±5,0 ^{aA}	63,0±4,5 ^{aA}	43,5±4,5 ^{bA}
	40	58,5±6,0 ^{aA}	59,0±6,0 ^{aA}	34,0±3,5 ^{bA}
	400	58,5±7,0 ^{aA}	61,5±5,0 ^{aA}	31,0±3,5 ^{bA}
CaSO ₄	0,4	59,0±6,0 ^{aA}	63,0±6,0 ^{aA}	30,5±4,0 ^{bA}
	4	61,0±4,0 ^{aA}	64,0±3,0 ^{aA}	28,5±3,0 ^{bA}
	40	63,5±3,0 ^{aA}	63,0±3,0 ^{aA}	28,5±3,0 ^{bA}
	400	64,5±3,0 ^{aA}	62,5±3,0 ^{aA}	32,0±3,0 ^{bA}

aA,bB,Cc: letras minúsculas diferentes na mesma linha e maiúsculas na mesma coluna denotam diferenças significativas ($p<0,05$).

Após a ejaculação, os espermatozoides passam por um processo de capacitação, e a reação acrossômica é acompanhada pelo aumento da concentração intracelular de cálcio. Segundo alguns pesquisadores, o influxo de cálcio extracelular é muito importante, no final da capacitação e reação acrossomal, pois o estoque intracelular deste íon é insuficiente para todo este processo, esgotando-se rapidamente, durante o início da capacitação (DRAGILEVA *et al.*, 1999; FLESH e GARDELLA, 2000); uma vez que o sêmen diluído pode começar tal processo, visto que as diluições normalmente são altas e a presença de plasma seminal é praticamente nula (BORTOLOZZO *et al.*, 2005).

No reprodutor suíno, as modificações da permeabilidade de membrana aos íons e, em particular, ao cálcio, durante a capacitação, seriam responsáveis pela mudança da motilidade dos espermatozoides (DARSZON *et al.*, 1999).

Uma importante indicação das alterações que ocorrem na membrana plasmática é a mudança na permeabilidade dessa membrana, ocorrendo um aumento desse parâmetro para corantes; um aumento, também, das concentrações intracelulares de ions, incluindo o cálcio, assim como alterações nos canais iônicos (JOHNSON *et al.*, 2000).

Como já afirmado anteriormente, a presença de cálcio na célula espermática é de suma importância para a capacitação espermática e reação acrossomal, proporcionando à célula uma hiperativação na sua motilidade. No entanto, os resultados obtidos neste trabalho sugerem a possibilidade de que a utilização de cálcio deve ser necessária, apenas quando a fecundação for realizada a curto prazo, visto que o cálcio proporciona aos espermatozoides as modificações necessárias a nível membranar para que ocorra a fecundação (DARSZON *et al.*, 1999).

Acredita-se que para a conservação do sêmen, a longo prazo, a presença de cálcio no meio diluente, pode acarretar em um déficit na porcentagem de células vivas, visto que essa substância pode causar uma hiperatividade, ocasionando um maior consumo de ATP, um aumento na metabolização celular e, como consequência, uma maior produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Essas ROS, em pequenas quantidades, exercem efeito fisiológico, como a capacitação espermática, hiperativação e reação acrossomal. Contudo, em quantidades elevadas, elas tornam-se prejudiciais para os espermatozoides (AITKEN, 1997; AITKEN e FISHER, 1994). Os danos provocados pelo estresse oxidativo resultam na diminuição da motilidade espermática, alterações na membrana plasmática e diminuição da sobrevivência celular (GRIVEAU e LELANNOU, 1997). Entretanto, essa afirmativa da ação das ROS para longo prazo de conservação, no caso do espermatozoide suíno, seria interessante que fosse testada e confirmada por experimentação.

CONCLUSÕES

A adição dos sais de cálcio proporciona hiperativação aos espermatozoides, podendo ser uma prática útil para doses de sêmen que serão utilizadas a curto prazo, logo após seu preparo; uma vez que os diferentes sais de cálcio não apresentaram efeito negativo junto às membrana plasmática, tendo ela se mantido íntegra, a adição do mesmo poderá proporcionar melhores resultados de fertilização do sêmen. Por outro lado seria interessante testes suplementares para se verificar e confirmar esses efeitos em uma conservação do sêmen suíno a longo prazo.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, J.; FISHER, H. Reactive oxygen species generation and human spermatozoa: the balance of benefit and risk. *Bioessays*, v.16, p.259-267, 1994.
- AITKEN R.J. Molecular mechanisms regulating human sperm function, *Molecular Humain Reproduction*, v.3, p.169-173, 1997.
- ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; RALFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. *Molecular biology of the cell*, 4^{ed.}, New York: Garland Science, p.1463, 2002.

- BOOTMAN, M.P., COLLINS, T.J., PEPIATT, C.M., PROYHERO, L.S., MACKENZIE, L., DE SMET, P., TRAVERS, M., TOVEYS, S.C., SEO, J.T., BERRIDGE, M.J., CICCOLINI, F., LIPP, P. Calcium signaling – an overview. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v.12, p.3-10, 2001.
- BORTOLOZZO, F. P.; WENTZ, L.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.33, n.1, p.17-32, 2005.
- CORRÊA, M.N.; MEINCKE, W.; LUCIA, J.R.T.; DESCHAMPS, J.C. Inseminação artificial em suínos. Copyright. Pelotas, Brasil, p.194, 2001.
- DARSZON, A.; LIÉVANO, A.; BELTRÁN, C. Ions channels: key elements in gamete signaling. *Current Topics in Developmental Biology*, v.34, p.117-167, 1996.
- DARSZON, A.; LABARCA, P.; ISHIGAKI, T.; ESPINOSA, F. Ion channels in sperm physiology. *Physiological Review*, v.79, n.2, p.481-510, 1999.
- DRAGILEVA, E.; RUBINSTEIN, S.; BREITBART, H. Intracellular Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATPase regulates calcium influx and acrosomal exocytosis in bull and ram spermatozoa. *Biology of Reproduction*, v.61, p.1226-1234, 1999.
- FRASER, L.R. Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirements during mouse sperm capacitation and fertilization *in vitro*. *Journal Reproduction Fertility*, v.81, p.77-89, 1987.
- FLESH, F.M.; GARDELLA, B.M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1469, p.197-235, 2000.
- GADAE, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.431-444, 2005.
- GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. As bases farmacológicas da terapêutica. 8ª ed. Rio de Janeiro: Granabara Koogan, p.1232, 1991.
- GRIVEAU, J.F.; LELANNOU, D. Influence of oxygen tension on reactive oxygen species production and human sperm function. *International Journal of Andrology*, v.20, p.195-200, 1997.
- HO, H.C.; SUAREZ, S.S., An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular Ca^{2+} store is involved in regulating sperm hyperactivated motility. *Biology of Reproduction*, v.65, p.1606-1615, 2001.
- JOHNSON, L.A.; WEITZE, K. F.; FISER, P.; MAXWELL, W. M. C. Storage of boar semen. *Animal Reproduction Science*, v.62, p.143-172, 2000.
- KIRICHOK, Y.; NAVARRO, B.; CLAPHAM, D. E. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated Ca^{2+} channel. *Letters*, v.439, p.731-740, 2006.
- LIMA, F. P. Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática de semên resfriado de suíno. 2006. p.14-35. Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, Minas Gerais, 2006.

- MARÍN-BRIGGILER, C. I.; GONZALEZ-EXHEVERRÍA, F.; BUFFONE, M.; CALAMERA, J. C.; TEZÓN, J. G.; VAZQUEZ-LEVIN, M. H. Calcium requirements for human sperm function *in vitro*. *Fertility and Sterility*, v.79, n.6, p.1396-1403, 2003.
- MARQUEZ, B.; SUAREZ, S.S. Different signaling pathways in bovine sperm regulate capacitation and hyperactivation. *Biology of Reproduction*, v.70, p.1626-1633, 2004.
- MARQUEZ, B.; IGNOTZ, G.; SUAREZ, S.S. Contributions of extracellular and intracellular Ca^{2+} to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactive CatSper 1 and CatSper 2 null sperm. *Developmental Biology*, v.303, p.214-221, 2007.
- MARTIN RILLO, S., MARTINEZ, E., GARCIA ANTIGA, C., DE ALBA, C. Boar Semen evaluation in practise. *Reproduction in Domestic Animals*. v.31, p.519-526, 1996.
- NAKAMURA, M.; MORIYA, M.; BABA, T.; MICHIKAWA, Y.; YAMANOE, T.; ARAI, K.; OKINAGA, S.; KOBAYASHI, T. An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into acrossomo of rat sperm. *Experimental Cell Research*, v.205, p.101-110, 1993.
- SMITAL, J. Effects influencing boar semen. *Animal Reproduction Science*. v.110, p.335-346, 2009.
- STAUSS, C. R.; VOTTA, T. J.; SUAREZ, S. S. Sperm motility hiperactivation facilitates of the hamster zona pellucida. *Biology of Reproduction*, v.53, p.1280-1285, 1995.
- SUAREZ, S.S.; VAROSI, S.M., DAI, X. Intracellular calcium increase with hyperactivation in intact, moving hamster sperm and oscillates with the flagellar beat cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.90, p.4660 – 4664, 1993.
- TONIOLLI, R.; COMBARNOUS, Y. Adição de cálcio ($CaCl_2$) ao diluidor do sêmen reprodutos: efeito sobre a motilidade espermática. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v.23, n.1, p.33-40, 1999.
- YANAGIMACHI, R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. *Gamete Research*, v.5, p.323-344, 1982.
- YANAGIMACHI, R. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, p.189-317, 1994.
- YOSHIDA, M.; INABA, K.; ISHIDA, K.; MORISAWA, M. Calcium and cyclic AMP mediated sperm activation, but Ca^{2+} alone contributes sperm chemotaxis in the ascidian *Ciona savignyi*. *Development Growth & Differentiation*, v.36, n.6, p.589-595, 1994.
- YOSHIDA, M.; ISHIKAWA, M.; DE SANTIS, R.; MORISAWA, M. Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm. *Proceedings of the National Academy of Science*, v.100, n.1, p.149-154, 2003.