

Efeito da Adição de Cálcio sobre a Hiperativação Espermática: Avaliação Computadorizada

Effect of Adding Calcium on Spermatic Hyperactivation: Computerized Evaluation

Ricardo Toniolli^{a*}; Iara Gonçalves Roberto^a; Airton Alencar de Araújo^b; Darlete Lima Matos^a; Lina Raquel Santos Araújo^b

^aUniversidade Estadual do Ceará, Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia do Sêmen. CE, Brasil.

^bUniversidade Estadual do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. CE, Brasil.

*E-mail: ricardo.toniolli@uece.br

Resumo

Estudos mostram que o íon cálcio é um mensageiro intracelular que regula fenômenos celulares fisiológicos, como a motilidade e fosforilação de enzimas. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se a adição de diferentes tipos e concentrações de íons cálcio ao diluente BTS para sêmen suíno, promove hiperativação espermática. O sêmen de 4 varrões foi coletado durante dez semanas e seus parâmetros foram analisados. O experimento contou com a utilização de diferentes tipos de cálcio: carbonato de cálcio (CaCO_3), hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), fostato dibásico anidro de cálcio (CaHPO_4), sulfato hidratado de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e sulfato anidro de cálcio (CaSO_4), distribuídos em diferentes concentrações: 0mM = controle; 0,4mM e 4mM. As amostras foram armazenadas a 17 °C e posteriormente incubadas a 37 °C para a avaliação computadorizada, realizada do D0 (dia da coleta) até D2 (último dia de incubação). Os testes de viabilidade e morfologia espermática foram realizados no D0 e D2. Os resultados para a concentração de 4 mM (CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4) indicaram um aumento da velocidade média da trajetória ($\geq 40 \mu\text{m/s}$) e da frequência de batimento cruzado ($\geq 8,0\text{Hz}$), além da redução da linearidade ($\leq 35\%$). Concluiu-se que a adição de 4 mM de CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4 gerou a hiperativação das células espermáticas e não exerceu efeito negativo sobre a membrana espermática, ressaltando-se que a hiperativação das células espermáticas poderia aumentar a capacidade fertilizante dos espermatozoides em fertilização *in vitro* ou em processos de transferência de gametas intrafalopianos. Dessa forma, estudos adicionais são necessários para verificar a sua eficiência.

Palavras-chave: Espermatozoide. Motilidade. Suíno. Linearidade.

Abstract

Studies show that the calcium ion is intracellular messenger that regulates physiological cellular phenomena, such as motility and enzyme phosphorylation. The aim of the present study was to evaluate whether the addition of different types and concentrations of calcium ions to the BTS diluent for swine semen can promote sperm hyperactivation. The semen from 4 boars was collected during ten weeks and its parameters were analyzed. The experiment used different types of calcium: calcium carbonate (CaCO_3), calcium hydroxide (Ca(OH)_2), anhydrous calcium dibasic phosphate (CaHPO_4), hydrated calcium sulfate ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) and anhydrous calcium sulfate (CaSO_4), distributed in different concentrations: 0mM = control; 0.4mM and 4mM. The samples were stored at 17 °C and then incubated at 37 °C for computerized evaluation, performed from D0 (collection day) to D2 (last day of incubation). The viability and sperm morphology tests were performed on D0 and D2. The results for the concentration of 4mM (CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and CaSO_4) indicated an increase in the average path velocity ($\geq 40 \mu\text{m/s}$) and in the cross-beat frequency ($\geq 8.0\text{Hz}$), in addition to a reduction in linearity ($\leq 35\%$). It was concluded that the addition of 4mM of CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ and CaSO_4 generated the sperm cells hyperactivation and had no negative effect on the sperm membrane, emphasizing that the sperm cells hyperactivation could increase the sperm fertilizing capacity in *in vitro* fertilization or in intrafallopian gamete transfer processes. Thus, additional studies are necessary to verify its efficiency

Keywords: Sperm. Motility. Swine. Linearity.

1 Introdução

O íon cálcio funciona como um segundo mensageiro intracelular, apresentando uma ação regulatória de fenômenos celulares fisiológicos (BOOTMAN *et al.*, 2001). Sua concentração no citosol se mantém em níveis normalmente muito baixos (10^{-4} mM), enquanto essa é alta no líquido extracelular (1-2mM). Essa diferença de concentração favorece a formação de um gradiente através da membrana plasmática, que tende a conduzir o íon do líquido extracelular para dentro do citosol. Essa força iônica abre, temporariamente, os canais de Ca^{2+} , presentes na membrana plasmática, permitindo um

aumento da concentração do íon cálcio no interior do citosol, que por sua vez estimula proteínas celulares e favorece a motilidade espermática (ALBERTS *et al.*, 2004).

Na célula espermática, além de canais de Ca^{2+} que são localizados no flagelo, existem proteínas específicas que funcionam como canais catiônicos do espermatozoide (CatSper), localizadas, principalmente, na peça principal do flagelo (CARLSON *et al.*, 2003; VICENTE-CARRILLO *et al.*, 2017; LISHKO; MANNOWETZ, 2018). Os canais de liberação de Ca^{2+} com receptores inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3R_1) regulam a liberação de cálcio dos estoques em

resposta à ligação de IP3 e Ca₂⁺ (TAYLOR; TOVEY, 2010). Nos espermatozoides suínos, o IP₃R₁ está presente na peça intermediária e no acrossoma (HARAYAMA *et al.*, 2005) e o IP3R1 está localizado na região do colo dos espermatozoides e em menor densidade ao longo da membrana axonemal (GUGSSA *et al.*, 2010).

Alguns estudos mostraram que o íon cálcio desempenha um papel muito importante na regulação da motilidade espermática, principalmente, no momento da fertilização (MARQUEZ *et al.*, 2007; BERNABÒ *et al.*, 2010). A elevação da sua concentração intracelular nesta célula está relacionada a alguns eventos: capacitação, reação acrossômica, motilidade espermática hiperativada, entre outros (SUAREZ *et al.*, 1993).

A motilidade hiperativada é definida como o padrão de movimento flagelar apresentado pelo espermatozoide no sítio de fertilização, podendo ser estimulada por hormônios, íons e secreções do fluido luminal do oviduto. O íon Ca²⁺ tem se mostrado como crucial para a iniciação e manutenção da motilidade hiperativada (HO; SUAREZ, 2001), que é caracterizada pela alta amplitude de inclinação flagelar, pela redução da linearidade espermática e pelo aumento da velocidade em linha reta (BASIOURA *et al.*, 2019).

O principal método de determinação da hiperativação é a avaliação pelo sistema de análise computadorizada que permite analisar as características seminais mais precisamente, observando a redução da linearidade espermática, o aumento da amplitude do deslocamento lateral da cabeça e o aumento da velocidade média em linha reta (BASIOURA *et al.*, 2019).

A adição de cálcio ao diluente de sêmen durante a inseminação poderia aumentar a capacidade de fertilização dos espermatozoides em fertilização *in vitro* ou em processos de transferência de gametas intrafalopianos. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar se diferentes tipos e concentrações de íons cálcio no diluente BTS podem promover a hiperativação da célula espermática suína.

2 Material e Métodos

2.1 Coletas e avaliação do ejaculado *in natura*

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará, em 15 de janeiro de 2015, segundo processo nº 7512525/2015 de 30/11/2015, por ter atendido os critérios solicitados pelo CEUA/UECE. As coletas de sêmen foram realizadas na Granja Regina no município de Maranguape-Ce, utilizando-se quatro varrões da raça Dalland, com idades variando entre 1,5 a 3 anos, mantidos sob o mesmo regime de estabulação e manejo alimentar (2Kg de ração/dia). O sêmen dos reprodutores suínos foi coletado uma vez por semana, durante dez semanas consecutivas (n=40), por meio da técnica da mão enluvada em recipiente com capacidade de 600 mL, coberto por gaze e protegido em copo térmico de coleta. Foi utilizado o ejaculado total de cada reprodutor após a separação da parte gelatinosa.

O ejaculado, após a coleta, foi levado ao laboratório da granja para avaliação da concentração (x10⁶ spztz/mL), volume (mL), total de espermatozoides (x10⁹ spztz), vigor espermático (0 a 5 - TONIOLLI, 1996) e motilidade espermática (%), utilizando-se microscópio óptico com aumento de 200x. Somente ejaculados com valores ≥80% de motilidade foram processados. Em seguida, o sêmen foi diluído no *Betsville Thawing Solution* (BTS), acondicionado em geladeira a 17 °C. Após todas as coletas e processamento do sêmen, os ejaculados foram transportados em caixa térmica para o Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da FAVET-UECE, no qual permaneceram em conservadora de sêmen a 17 °C, durante três dias.

2.2 Delineamento experimental

No experimento, foram testados cinco tipos de íons cálcio: carbonato de cálcio [CaCO₃]; hidróxido de cálcio [Ca(OH)₂]; fosfato dibásico anidro de cálcio [CaHPO₄]; sulfato diidratado de cálcio [CaSO₄.2 H₂O]; sulfato anidro de cálcio [CaSO₄]. Os íons foram adicionados ao diluente BTS em duas concentrações diferentes (0,4 e 4,0mM de Ca⁺⁺). Cada ejaculado foi dividido entre os diferentes tratamentos, a uma concentração final de 35 x10⁶ spztz/mL/tratamento. As amostras de cada tratamento foram armazenadas em tubos de ensaio de 3mL, correspondendo individualmente a cada um dos dias de análise (D0 = dia da coleta; D1 e D2), e conservadas em geladeira a uma temperatura entre 15 e 17 °C. Para cada dia de análises foram retirados os tubos equivalentes a cada ejaculado, em cada tratamento, para serem reaquecidos em banho-maria a 37 °C durante 10min, antes de serem feitas as diferentes análises. Particularmente, no dia da coleta (D0), o sêmen só era reaquecido em banho maria e analisado, após 6 horas de conservação em geladeira a 17 °C.

2.3 Análise computadorizada da motilidade espermática

O sêmen conservado era aquecido a 37 °C/10min e após este período de tempo, era coletada uma amostra para as análises computadorizadas da motilidade espermática, nos dias D0, D1 e D2, com auxílio de um microscópio de contraste de fases acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema *Sperm Class Analyser*[®] (SCA, Microptic S.L., versão 3.2.0). Para a análise, 5µL de cada amostra foram colocados em uma Câmara de Makler[®] (Sel-Medical Instruments), previamente aquecida a 37 °C, sendo avaliados os seguintes parâmetros: motilidade espermática (espermatozoides móveis, %); de velocidade média da trajetória dos espermatozoides rápidos (VAP, mm/s), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz) e linearidade (LIN, %).

2.4 Avaliação da vitalidade (vivos/mortos) e morfologia espermática

De cada tratamento, foram feitos dois esfregaços de sêmen, a fim de se proceder à análise da porcentagem de

células vivas/mortas e morfologia espermática. As amostras de sêmen para os esfregaços foram retiradas sempre após 10 minutos de reaquecimento do sêmen a 37 °C, realizadas nos seguintes dias de conservação: D0 (dia da coleta) e D2 (último dia). Em cada esfregaço foram contadas 200 células espermáticas.

As avaliações foram feitas por meio da microscopia óptica a um aumento de 400x. A solução corante utilizada foi a seguinte: 0,1g de azul de bromofenol; 0,4g de citrato de sódio e 10mL de água destilada. A osmolaridade da solução foi medida e, quando necessário, ajustada com água destilada entre 300 e 310mOsm, sendo guardada em geladeira a 17 °C. Na preparação do esfregaço foram juntadas duas gotas de 10µL, sendo uma de sêmen e a outra de corante com a mesma temperatura (37 °C) e homogenizou-se. Após 30 segundos, foi retirada uma gota dessa mistura e se realizou o esfregaço que permaneceu em temperatura ambiente para secagem antes da análise. Quanto à característica de vitalidade, os espermatozoides foram classificados em: 1) Vivos = células não coradas; 2) Mortos = células coradas. De acordo com a morfologia, os espermatozoides foram classificados em: 1) Normal; 2) Cabeça alterada; 3) Acrossomo alterado; 4) Peça intermediária alterada; 5) Cauda alterada; 6) Presença de gota citoplasmática proximal (BORTOLOZZO *et al.*, 2005; MEDEIROS *et al.*, 2006).

2.5 Análise Estatística

O presente trabalho foi conduzido sob um delineamento experimental de blocos ao acaso. Na análise estatística, os dados foram expressos na forma de média e desvio padrão e, posteriormente, as variáveis foram submetidas à análise

de variância (ANOVA). Aplicou-se Modelo Linear Geral (GLM), uma análise de variância multifatorial e os testes de Tukey e do Qui-quadrado, das variáveis paramétricas e não paramétricas, respectivamente, para comparações entre os dias de análises dos tratamentos e entre os tratamentos. Utilizou-se o programa de estatística Systat 7.0, analisando as diferenças entre os resultados com uma probabilidade de 5% ($p < 0,05$).

3 Resultados e Discussão

3.1 Sêmen *in natura*

Para o experimento, foi utilizado um total de vinte ejaculados, tendo-se como médias de todos os ejaculados para os parâmetros avaliados: concentração: $382 \pm 17 \times 10^6$ sptz/mL; volume: $332,5 \pm 11,4$ mL; total de espermatozoides: $126,0 \pm 6,0 \times 10^9$ sptz; vigor espermático: $4,3 \pm 0,1$ e motilidade espermática: $93 \pm 1,0\%$. Tais parâmetros estão de acordo os observados por Resende *et al.* (2019) para varrões dentro da mesma faixa de idade, sendo considerados normais e permitindo a utilização dos ejaculados.

3.2 Avaliação computadorizada

Os valores percentuais médios dos espermatozoides móveis das amostras conservadas em diluentes com diferentes concentrações de cálcio estão representados no Quadro 1. Somente as amostras que receberam 4,0mM de fostato dibásico anidro de cálcio (CaHPO_4), sulfato diidratado de cálcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) e sulfato anidro de cálcio (CaSO_4), apresentaram valores de espermatozoides móveis, significativamente, maiores que o controle (0 mM-BTS) e outras formas do íon cálcio nos dias 0, 1 e 2 de análise ($p < 0,05$).

Quadro 1 - Análise computadorizada da motilidade espermática (% de móveis), de amostras adicionadas de diferentes tipos e concentrações de íons cálcio (mM), em três dias de conservação do sêmen a 17 °C

Tratamentos	Concentração	Espermatozoides Móveis		
		D0	D1	D2
BTS (controle)	0,0	42,9±5,7 ^{aA}	22,9±5,0 ^{bA}	4,4±1,0 ^{cA}
CaCO ₃	0,4	50,7±5,0 ^{aA}	23,4±5,0 ^{bA}	7,8±2,7 ^{cA}
	4,0	57,3±6,0 ^{aA}	30,2±6,9 ^{bA}	10,7±2,2 ^{cA}
Ca(OH) ₂	0,4	51,8±5,4 ^{aA}	25,3±5,7 ^{bA}	6,7±1,4 ^{cA}
	4,0	45,2±6,3 ^{aA}	12,2±3,6 ^{bA}	6,2±1,1 ^{bA}
CaHPO ₄	0,4	41,4±6,2 ^{aA}	17,2±4,0 ^{bA}	5,0±0,5 ^{bA}
	4,0	69,2±5,3 ^{aB}	60,1±5,7 ^{aB}	37,3±7,3 ^{bB}
CaSO ₄ ·2 H ₂ O	0,4	44,3±6,3 ^{aA}	15,4±3,9 ^{bA}	7,2±1,7 ^{bA}
	4,0	75,4±2,9 ^{aB}	64,0±6,2 ^{aB}	28,4±5,9 ^{bB}
CaSO ₄	0,4	43,0±7,3 ^{aA}	23,2±5,9 ^{abA}	12,8±5,0 ^{bA}
	4,0	65,1±4,5 ^{aB}	63,6±6,7 ^{aB}	41,5±7,0 ^{bB}

CaCO₃ = carbonato de cálcio; Ca(OH)₂ = hidróxido de cálcio; CaHPO₄ = fostato dibásico anidro de cálcio; CaSO₄·2 H₂O = sulfato diidratado de cálcio; CaSO₄ = sulfato anidro de cálcio. ^{a,b,c}comparação na mesma linha, entre dias de conservação; ^{A,B,C}comparação na mesma coluna, entre tratamentos. Letras distintas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

As amostras conservadas em diluente com 0,4 e 4,0mM de CaCO₃, CaHPO₄, CaSO₄·2H₂O e CaSO₄ tiveram os valores de VAP significativamente maiores que o controle (BTS) e que o diluente acrescido de Ca(OH)₂ em ambas as concentrações, no

D0 de análise ($p < 0,05$). No D1, apenas as amostras conservadas em diluente com 0,4 e 4,0mM de CaHPO₄, CaSO₄·2H₂O e CaSO₄ apresentaram valores de VAP significativamente superiores ao controle e ao diluente acrescido de CaCO₃ e Ca(OH)₂ em ambas as

concentrações ($p < 0,05$). No caso dos tratamentos com CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4 , somente na concentração de 4,0mM os valores de VAP foram significativamente maiores que os demais tratamentos no D2 de análise (Quadro 2). Estes resultados são

importantes, em função do fato de que a motilidade espermática é um bom indicador da fertilidade espermática nas espécies domésticas e apresenta alta correlação com a taxa de penetração em oócitos tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (GADEA, 2005).

Quadro 2 - Análise computadorizada da velocidade média da trajetória (VAP - $\mu\text{m/s}$), de amostras adicionadas de diferentes tipos e concentrações de íons cálcio (mM), em três dias de conservação do sêmen a 17 °C

Tratamentos	Concentração	VAP		
		D0	D1	D2
BTS (controle)	0,0	40,6±1,3 ^{aA}	31,5±4,0 ^{bA}	10,7±3,0 ^{cA}
CaCO_3	0,4	49,1±1,4 ^{aB}	35,4±3,8 ^{bA}	13,7±2,8 ^{cA}
	4,0	45,1±1,2 ^{aB}	30,6±4,0 ^{bA}	17,6±3,7 ^{cA}
Ca(OH)_2	0,4	39,7±1,4 ^{aA}	29,0±3,4 ^{bA}	10,4±2,9 ^{cA}
	4,0	37,5±3,2 ^{aA}	26,7±3,4 ^{bA}	8,8±3,0 ^{bA}
CaHPO_4	0,4	47,4±2,3 ^{aB}	40,2±3,2 ^{bB}	4,9±1,5 ^{cA}
	4,0	50,0±1,9 ^{aB}	38,0±1,1 ^{abB}	30,7±3,3 ^{bB}
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4	48,0±2,0 ^{aB}	42,4±3,7 ^{bB}	10,4±3,0 ^{cA}
	4,0	47,0±1,5 ^{aB}	41,4±3,3 ^{aB}	25,2±3,2 ^{bB}
CaSO_4	0,4	45,2±2,7 ^{aB}	40,8±2,2 ^{aB}	13,5±3,4 ^{bA}
	4,0	46,5±1,2 ^{aB}	42,5±1,6 ^{aB}	33,9±3,8 ^{bB}

CaCO_3 = carbonato de cálcio; Ca(OH)_2 = hidróxido de cálcio; CaHPO_4 = fosfato dibásico anidro de cálcio; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = sulfato diidratado de cálcio; CaSO_4 = sulfato anidro de cálcio. ^{a,b,c}comparação na mesma linha, entre dias de conservação; ^{A,B,C}comparação na mesma coluna, entre tratamentos. Letras distintas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

Considerando a importância do cálcio (Ca^{2+}) na regulação da capacitação espermática, hiperativação e reação do acrossoma, pouco se sabe sobre o mecanismo molecular de ação desse íon nesse processo. Li *et al.* (2016) observaram que o Ca^{2+} regula a motilidade espermática e a fosforilação de proteínas através da regulação do ATP intracelular produzido pela glicólise e que os espermatozoides incubados por 2h sob maiores concentrações extracelulares de Ca^{2+} ($\geq 3,0\text{mM}$), a motilidade espermática e a fosforilação de proteínas são inibidas. Nesse sentido, o curto período de incubação, que proporciona uma menor quebra do ATP e disponibilização de energia intracelular, bem como as diferentes formas de apresentação do cálcio e sua biodisponibilidade, podem ter contribuído para os diferentes

resultados da motilidade observados neste estudo.

Nas duas concentrações utilizadas, as amostras de sêmen conservadas em diluente contendo CaCO_3 , Ca(OH)_2 , CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4 apresentaram valores de BCF significativamente maiores que o tratamento controle, no D0 ($p < 0,05$). No D1, apenas as amostras conservadas em diluente contendo CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4 tiveram valores de BCF significativamente superiores ao controle e aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Quando avaliados os resultados em D2, somente as amostras de sêmen em diluente adicionado de 4,0mM de CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4 mostraram valores de BCF significativamente maiores que os demais tratamentos (Quadro 3).

Quadro 3 - Análise computadorizada da frequência de batimento cruzado (BCF - Hz), de amostras adicionadas de diferentes tipos e concentrações de íons cálcio (mM), em três dias de conservação do sêmen a 17 °C

Tratamentos	Concentração	Batimento Cruzado		
		D0	D1	D2
BTS (controle)	0,0	5,3±0,4 ^{aA}	4,0±0,5 ^{bA}	1,2±0,5 ^{cA}
CaCO_3	0,4	8,4±0,4 ^{aB}	4,2±0,4 ^{bA}	2,0±0,7 ^{cA}
	4,0	7,8±0,3 ^{aB}	4,4±0,3 ^{bA}	2,5±0,8 ^{cA}
Ca(OH)_2	0,4	8,2±0,4 ^{aB}	4,2±0,3 ^{bA}	1,7±0,6 ^{cA}
	4,0	6,3±0,7 ^{aA}	3,4±0,6 ^{bA}	1,2±0,4 ^{bA}
CaHPO_4	0,4	7,9±0,5 ^{aB}	5,2±0,2 ^{bB}	0,3±0,1 ^{cA}
	4,0	8,4±0,4 ^{aB}	7,6±0,5 ^{abB}	5,6±0,8 ^{bB}
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4	8,0±0,5 ^{aB}	5,0±0,1 ^{bB}	1,7±0,6 ^{bA}
	4,0	8,6±0,3 ^{aB}	7,0±0,6 ^{aB}	4,5±0,8 ^{bB}
CaSO_4	0,4	6,7±0,7 ^{aB}	6,0±1,0 ^{aB}	1,7±0,7 ^{bA}
	4,0	8,4±0,3 ^{aB}	7,4±0,4 ^{aB}	5,0±0,8 ^{bB}

CaCO_3 = carbonato de cálcio; Ca(OH)_2 = hidróxido de cálcio; CaHPO_4 = fosfato dibásico anidro de cálcio; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = sulfato diidratado de cálcio; CaSO_4 = sulfato anidro de cálcio. ^{a,b,c}comparação na mesma linha, entre dias de conservação; ^{A,B,C}comparação na mesma coluna, entre tratamentos. Letras distintas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

Observou-se que nos dias D0, D1 e D2, o sêmen conservado nas duas concentrações e nos diferentes tipo de íon cálcio (CaCO_3 , Ca(OH)_2 , CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4), os valores de LIN foram, significativamente, menores que o controle (Quadro 4). Essa redução da linearidade, associada ao

aumento da velocidade média da trajetória e da frequência de batimento cruzado, gerada pela adição de íons Ca^{2+} ao meio, está relacionada à hiperativação das células espermáticas, através da abertura dos canais iônicos da membrana plasmática, e aumento dos íons cálcio no interior do citosol.

Quadro 4 - Análise computadorizada da velocidade média da linearidade (LIN - %), de amostras adicionadas de diferentes tipos e concentrações de íons cálcio (mM), em três dias de conservação do sêmen a 17 °C

Tratamentos	Concentração	LIN		
		D0	D1	D2
BTS (controle)	0,0	50,1±1,7 ^{aA}	45,3±3,6 ^{bA}	30,0±2,3 ^{bA}
CaCO_3	0,4	35,8±1,7 ^{aB}	23,4±3,4 ^{bB}	18,6±2,7 ^{bB}
	4,0	39,7±2,0 ^{aB}	24,6±2,9 ^{bB}	15,2±3,0 ^{cB}
Ca(OH)_2	0,4	35,8±1,2 ^{aB}	28,3±2,3 ^{aB}	11,9±3,0 ^{bB}
	4,0	39,4±3,0 ^{aB}	27,5±2,8 ^{bB}	8,0±2,4 ^{cB}
CaHPO_4	0,4	43,7±1,8 ^{aB}	27,5±2,8 ^{bB}	7,3±2,2 ^{cB}
	4,0	37,8±1,2 ^{aB}	33,0±1,1 ^{aB}	16,5±2,3 ^{bB}
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4	33,7±1,9 ^{aB}	28,8±3,3 ^{bB}	13,3±2,7 ^{cB}
	4,0	38,4±1,1 ^{aB}	31,6±2,7 ^{aB}	16,7±2,0 ^{bB}
CaSO_4	0,4	30,9±2,5 ^{aB}	25,6±3,5 ^{aB}	13,3±2,7 ^{bB}
	4,0	42,5±2,9 ^{aB}	33,4±1,2 ^{aB}	17,3±2,5 ^{bB}

CaCO_3 = carbonato de cálcio; Ca(OH)_2 = hidróxido de cálcio; CaHPO_4 = fosfato dibásico anidro de cálcio; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = sulfato diidratado de cálcio; CaSO_4 = sulfato anidro de cálcio. ^{a,b,c}comparação na mesma linha, entre dias de conservação; ^{A,B,C}comparação na mesma coluna, entre tratamentos. Letras distintas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

Os valores médios de LIN encontrados no presente trabalho são $\leq 35\%$, o que sugere uma hiperativação, visto que espermatozoides suínos hiperativados *in vitro* possuem LIN menor que 32% (BASIOURA *et al.*, 2019). Uma linearidade (LIN) de $16 \pm 11\%$ e frequência de batimento cruzado (BCF) de $8,7 \pm 4,1\text{Hz}$ caracterizam a trajetória *star-spin* (girar em rotação), típica da hiperativação descrita no estudo de Robertson *et al.* (1988). O grupo de espermatozoides com trajetória transitória para a hiperativação é caracterizado por $19 < \text{LIN} \leq 34\%$ e BCF igual a $10,9 \pm 3,9\text{Hz}$ (ROBERTSON *et al.*, 1988). Os espermatozoides não hipertivados são caracterizados por LIN de $53 \pm 37\%$ e BCF de $5,3 \pm 5,2\text{Hz}$ (ROBERTSON *et al.*, 1988). Segundo Basioura *et al.* (2019), espermatozoides hiperativados são caracterizados por LIN $< 32,0\%$, velocidade em linha reta $> 97\mu\text{m/s}$ e amplitude do deslocamento lateral da cabeça $> 3,5\mu\text{m}$. Observou-se, também, que em todos os tratamentos houve uma redução progressiva de VAP, LIN e BCF ao longo dos tempos de análise (D0, D1 e D2), provavelmente, em função de danos causados durante o resfriamento, quando podem ocorrer lesões irreversíveis que causam alterações na permeabilidade da membrana espermática, no potencial da membrana mitocondrial e na integridade do DNA, reduzindo assim a viabilidade e parâmetros espermáticos durante o armazenamento (BRYLA; TRZCINSKA, 2015).

Autores como Stauss *et al.* (1995) utilizaram um meio de capacitação com 2,4mM de CaCl_2 , obtendo vantagem na penetração da zona pelúcida do oócito. Por outro lado,

demonstraram que a hiperativação de espermatozoides de camundongos foi suprimida após ter sido iniciada por meio do uso de antagonistas dos canais de cálcio. Suarez; Dai (1992) concluíram que espermatozoides de camundongos foram capazes de penetrar no meio viscoelástico mais efetivamente depois de hiperativados, utilizando um meio para hiperativação dos espermatozoides que continha também CaCl_2 na mesma concentração. Assim, pode-se afirmar que a hiperativação seria uma vantagem para o movimento dos espermatozoides, por meio do fluido viscoso do oviducto e da matrix viscoelástica do *cumulus*.

Toniolli *et al.* (2018) utilizaram os mesmos tipos de íons cálcio e sugeriram hiperativação espermática nas concentrações 0,4 e 4mM, confirmada neste estudo com a adição de 4mM de CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4 ao diluente BTS. No presente trabalho, por meio das análises de VAP, LIN e BCF, observou-se que a adição *in vitro* de íons cálcio na concentração de 4mM de CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4 ao diluente de sêmen suíno (BTS) gerou a hiperativação das células espermáticas, o que seria importante para estudos com FIV (fertilização *in vitro*) em suínos e em outras espécies (ROMAR *et al.*, 2019).

3.3 Viabilidade espermática

Os valores médios percentuais de espermatozoides vivos das amostras, que receberam diferentes concentrações de carbonato de cálcio, hidróxido de cálcio, fosfato dibásico anidro de cálcio, sulfato diidratado de cálcio e

sulfato anidro de cálcio em D0 e D2, estão representados no Quadro 5. Nas análises do D0 e D2 não houve diferenças significativas entre os valores percentuais de espermatozoides encontrados no sêmen conservado em diluentes com as diferentes concentrações (0,4 e 4,0mM)

de CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4 e no tratamento controle ($p > 0,05$). Observou-se, também, que em todos os tratamentos, as porcentagens de espermatozoides vivos encontrados no D0 foram significativamente maiores do que os de D2 ($p < 0,05$).

Quadro 5 - Porcentagem de espermatozoides vivos (%), de amostras adicionadas de diferentes tipos e concentrações de íons cálcio (mM), em dois dias de conservação do sêmen a 17 °C

Tratamentos	Concentração	Espermatozoides Vivos	
		D0	D2
BTS (controle)	0,0	78,5±2,0 ^{aA}	60,0±2,5 ^{bB}
CaCO_3	0,4	80,0±1,5 ^{aA}	64,0±2,0 ^{bB}
	4,0	80,5±1,5 ^{aA}	56,5±2,0 ^{bB}
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0,4	81,5±1,5 ^{aA}	55,0±1,5 ^{bB}
	4,0	79,0±1,5 ^{aA}	54,0±3,0 ^{bB}
CaHPO_4	0,4	77,5±2,0 ^{aA}	58,0±2,0 ^{bB}
	4,0	80,0±2,0 ^{aA}	56,0±2,0 ^{bB}
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4	83,0±1,5 ^{aA}	59,5±1,5 ^{bB}
	4,0	84,0±1,5 ^{aA}	56,5±2,5 ^{bB}
CaSO_4	0,4	81,0±2,0 ^{aA}	60,0±2,0 ^{bB}
	4,0	81,0±1,5 ^{aA}	56,5±2,0 ^{bB}

CaCO_3 = carbonato de cálcio; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ = hidróxido de cálcio; CaHPO_4 = fosfato dibásico anidro de cálcio; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = sulfato diidratado de cálcio; CaSO_4 = sulfato anidro de cálcio. ^{a,b,c}comparação na mesma linha, entre dias de conservação; ^{A,B,C}comparação na mesma coluna, entre tratamentos. Letras distintas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Fonte: Dados da pesquisa.

Embora esses sais tenham exercido efeito sobre a motilidade espermática, linearidade e frequência de batimento cruzado, não foram capazes de influenciar a característica viabilidade espermática. Provavelmente, as amostras de sêmen cujo diluente foi acrescido de 0,4 e 4,0mM de CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{OH})_2$, podem ter sofrido uma queda acentuada da motilidade após um dia de acondicionamento do sêmen, sem ter havido, por outro lado, uma alteração significativa na porcentagem de células vivas, uma vez que sobre essa característica, as possibilidades de influência positiva ou negativa, são multifatoriais. No reprodutor suíno, as modificações da permeabilidade de membrana aos íons e, em

particular, ao íon cálcio, seriam responsáveis pela mudança da motilidade dos espermatozoides (hiperativação) (VICENTE-CARRILLO *et al.*, 2017), ou seja, modificações bioquímicas importantes para a função normal dos espermatozoides (NISHIMURA, 1993).

3.4 Morfologia espermática

Observou-se que, durante o período de conservação do sêmen (D0 e D2), tanto no BTS quanto nas diferentes concentrações de íon cálcio, não houve diferenças significativas entre os valores de espermatozoides normais ($p > 0,05$) (Quadro 6).

Quadro 6 - Porcentagem de espermatozoides morfológicamente normais (%), de amostras adicionadas de diferentes tipos e concentrações de íons cálcio (mM), em dois dias de conservação do sêmen a 17 °C

Tratamentos	Concentração	Espermatozoides Normais	
		D1	D2
BTS (controle)	0,0	87,0±1,5 ^{aA}	84,0±2,0 ^{aA}
CaCO_3	0,4	87,0±2,0 ^{aA}	84,5±2,0 ^{aA}
	4,0	86,0±1,5 ^{aA}	85,0±1,5 ^{aA}
$\text{Ca}(\text{OH})_2$	0,4	87,5±1,5 ^{aA}	84,0±2,0 ^{aA}
	4,0	86,0±1,0 ^{aA}	85,5±1,5 ^{aA}
CaHPO_4	0,4	88,0±2,0 ^{aA}	84,5±2,0 ^{aA}
	4,0	87,0±2,0 ^{aA}	84,5±2,0 ^{aA}
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4	84,5±2,0 ^{aA}	86,0±1,5 ^{aA}
	4,0	87,0±1,5 ^{aA}	84,0±2,0 ^{aA}
CaSO_4	0,4	85,0±1,5 ^{aA}	85,0±1,5 ^{aA}
	4,0	87,0±1,5 ^{aA}	84,0±2,0 ^{aA}

CaCO_3 = carbonato de cálcio; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ = hidróxido de cálcio; CaHPO_4 = fosfato dibásico anidro de cálcio; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = sulfato diidratado de cálcio; CaSO_4 = sulfato anidro de cálcio. ^{a,b,c}comparação na mesma linha, entre dias de conservação; ^{A,B,C}comparação na mesma coluna, entre tratamentos. Letras distintas diferenças significativas ($p < 0,05$).

Fonte: dados da pesquisa.

Foi encontrada uma porcentagem baixa de alterações morfológicas: 1% cabeça cabeça globosa e piriforme; 5 a 10% acrossoma acrossoma difuso; 3 a 7% peça intermediária dobrada na base; 8 a 13% cauda cauda dobrada e fortemente enrolada e 2 a 6% de gota citoplasmática proximal. Estes resultados foram a variação da porcentagem de problemas morfológicos entre todos os tratamentos, não apresentando diferenças significativas ($p > 0,05$) entre os valores encontrados nas diversas concentrações (0,4 e 4,0mM) de cálcio e no controle.

Assim, pode-se afirmar que, embora esses sais tenham exercido efeito sobre a motilidade espermática, linearidade e frequência de batimento cruzado, não foi possível identificar algum tipo de ação protetora sobre a morfologia espermática. Essa afirmativa se baseia no fato de que, comparando-se as porcentagens de espermatozoides morfolologicamente normais, entre os tratamentos e o lote controle, não houve diferenças significativas ($p > 0,05$), resultados esses que corroboraram com os de Toniolli *et al.* (2018). Uma importante indicação das alterações que ocorre na membrana plasmática foi a mudança de sua permeabilidade, ocorrendo um aumento da mesma para corantes, com um aumento das concentrações intracelulares de íons, incluindo o cálcio, assim como alterações nos canais iônicos (JOHNSON *et al.*, 2000).

4 Conclusão

A adição de 4mM de CaHPO_4 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e CaSO_4 gerou a hiperativação das células espermáticas e não exerceu efeito negativo sobre a membrana do espermatozoide, ressaltando-se que a hiperativação das células espermáticas poderia aumentar a capacidade fertilizante dos espermatozoides em fertilização *in vitro* ou em processos de transferência de gametas intrafalopianos. Assim, estudos são necessários para verificar a eficiência da hiperativação na fertilização *in vitro* de suínos e de outras espécies.

Referências

ALBERTS, B. *et al.* Biologia molecular da célula. Porto Alegre: Artmed, 2004.

BASIOURA, A. *et al.* Method agreement between three different chambers for comparative boar semen computer-assisted sperm analysis. *Reprod. Domest. Anim.*, v.54, Suppl.4, p.41–45, 2019. doi: 10.1111/rda.13494.

BERNABÒ, N.; MATTIOLI, M.; BARBONI, B. The spermatozoa caught in the net: the biological networks to study the male gametes post-ejaculatory life. *BMC Syst. Biol.*, v.4, n.87, p.1-12, 2010. doi: 10.1186/1752-0509-4-87.

BOOTMAN, M.P. *et al.* Calcium signaling – an overview. *Semin. Cell Develop. Biol.*, v.12, p.3-10, 2001. doi: 10.1006/scdb.2000.0211.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, L.; DALLANORA, D. Situação atual da inseminação artificial em suínos. *Acta Scie. Vet.*, v.33, n.1, p.17–32, 2005.

BRYŁA, M.; TRZCIŃSKA, M. Quality and fertilizing capacity of

boar spermatozoa during liquid storage in extender supplemented with different antibiotics. *Anim. Reprod. Sci.*, v.163, p.157-163, 2015. doi: 10.1016/j.anireprosci.2015.11.005.

CARLSON, A.E.; *et al.* CatSper 1 required for evoked Ca^{2+} entry and control of flagellar function in sperm. Proceedings of the *Nat. Acad. Sci.*, v.100, p.14864-14868, 2003. doi: 10.1073/pnas.2536658100.

GADEA, J. Sperm factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. *Theriogenology*, v.63, n.2, p.431-444, 2005. doi: 10.1016/j.theriogenology.2004.09.023.

GUGSSA, A.; *et al.* Localization of Guanylate Cyclase Receptor, Inositol Trisphosphate Receptor, and Calmodulin in Boar Spermatozoa. *Int. J. Biol.*, v. 2, n.1, p.13-18, 2010. doi: 10.5539/ijb.v2n1p13.

HARAYAMA, H.; MURASE, T.; MIYAKE, M. A cyclic adenosine 3',5'-monophosphate stimulates phospholipase C gamma1-calcium signaling via the activation of tyrosine kinase in boar spermatozoa. *J. Androl.*, v.26, p.732-740, 2005. doi: 10.2164/jandrol.05053.

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. *Biol. Reprod.*, v.65, p.1606–1615, 2001. doi: 10.1095/biolreprod65.5.1606.

JOHNSON, L.A.; *et al.* Storage of boar semen. *Anim. Reprod. Sci.*, v.62, p.143–172, 2000. doi: 10.1016/S0378-4320(00)00157-3.

LISHKO, P.V.; MANNOWETZ, N. CatSper: a unique calcium channel of the sperm flagellum. *Current Opin. Physiol.*, v.2, p.109-113, 2018. doi: 10.1016/j.cophys.2018.02.004.

MARQUEZ, B.; IGNOTZ, G.; SUAREZ, S.S. Contributions of extracellular and intracellular Ca^{2+} to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactivate CatSper 1 and CatSper 2 null sperm. *Develop. Biol.*, v.303, p.214–221, 2007. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.11.007.

MEDEIROS, A.A. *et al.* Utilização do azul de bromofenol conservado a 4° e 29 °C como método de coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. *Rev. Ciên. Agrár.*, n.46, p.287–297, 2006.

NISHIMURA, K. Effect of calcium ions on the malate-aspartate shuttle in slow-cooled boar spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.49, p.537–543, 1993. doi: 10.1095/biolreprod49.3.537.

RESENDE, P.C.S.L. *et al.* Relationship between pre-pubertal biometrical measures and sperm parameters for the selection of high genetic merit pure and crossbred boars. *Theriog.*, v.127, p.1-6, 2019. doi: 10.1016/j.theriogenology.2018.12.034.

ROBERTSON, L.; WOLF, D.P.; TASH, J.S. Temporal changes in motility parameters related to acrossomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. *Biol. Reprod.*, v.39, p.797–805, 1988. doi: 10.1095/biolreprod39.4.797.

ROMAR, R. *et al.* Pig in vitro fertilization: Where are we and where do we go? *Theriog.*, v.137, p.113-121, 2019. doi: 10.1016/j.theriogenology.2019.05.045.

STAUSS, C.R.; VOTTA, T.J.; SUAREZ, S.S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. *Biol. Reprod.*, v.53, p.1280–1285, 1995. doi: 10.1095/biolreprod53.6.1280.

SUAREZ, S.S.; DAI, X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. *Biol. Reprod.*, v.46, p.686–691, 1992. doi: 10.1095/biolreprod46.4.686.

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 *Nat. Acad. Sci.*, v.90, p.4660–4664, 1993. doi: 10.1073/pnas.90.10.4660.

TAYLOR, C.W.; TOVEY, S.C. IP (3) receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, v.2, n.12, p.1-22, 2010. doi: 10.1101/cshperspect.a004010.

TONIOLLI, R. Pouvoir fécondant des spermatozoïdes de verrat: amélioration des conditions de conservation. Tours-France:

Nouzilly, 1996.

TONIOLLI, R.; *et al.* Uso de diferentes íons de cálcio adicionados ao diluente de sêmen suíno resfriado. *Ciê. Anim.*, v.28, n.2, p.19-30, 2018.

VICENTE-CARRILLO, A.; ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. The CatSper channel modulates boar sperm motility during capacitation. *Reprod. Biol.*, v.17, n.1, p.69-78, 2017. doi: 10.1016/j.repbio.2017.01.001.