

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**IARA GONÇALVES ROBERTO**

**AVALIAÇÃO SUBJETIVA E COMPUTADORIZADA DO EFEITO DAS  
CONCENTRAÇÕES DE ÍONS CÁLCIO NO SÊMEN SUÍNO  
RESFRIADO**

**FORTALEZA-CE  
2008**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**IARA GONÇALVES ROBERTO**

**AVALIAÇÃO SUBJETIVA E COMPUTADORIZADA DO EFEITO DAS  
CONCENTRAÇÕES DE ÍONS CÁLCIO NO SÊMEN SUÍNO  
RESFRIADO**

**FORTALEZA-CE  
2008**

**IARA GONÇALVES ROBERTO**

**AVALIAÇÃO SUBJETIVA E COMPUTADORIZADA DO EFEITO DAS  
CONCENTRAÇÕES DE ÍONS CÁLCIO NO SÊMEN SUÍNO  
RESFRIADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

**Área de Concentração:** Reprodução e Sanidade Animal.

**Linha de Pesquisa:** Reprodução de carnívoros, onívoros, e aves.

**Orientador:** Prof. Dr. Ricardo Toniolli

**FORTALEZA-CE  
2008**

R639a	<p>Roberto, Iara Gonçalves</p> <p>Avaliação subjetiva e computadorizada do efeito das concentrações de íons cálcio no sêmen suíno resfriado / Iara Gonçalves Roberto. __ Fortaleza, 2008.</p> <p>85p. ; il.</p> <p>Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lúcia Daniel Machado da Silva</p> <p>Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.</p> <p>1. Cálcio. 2. Espermatozóide - motilidade. 3. Espermatozóide – hiperativação. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.</p> <p style="text-align: right;">CDD: 636.089</p>
-------	---

**Universidade Estadual do Ceará**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

**Título do Trabalho:** Avaliação subjetiva e computadorizada do efeito das concentrações de íons cálcio no sêmen suíno resfriado.

**Autora:** Iara Gonçalves Roberto

Defesa em: 20/08/2008

Conceito obtido: Satisfatório

Nota obtida: 9,3

**Banca Examinadora**

---

Profª. Dra. Lúcia Daniel Machado da Silva  
Universidade Estadual do Ceará  
**Presidente da Banca**

---

Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo  
Universidade Estadual do Ceará  
**Co-Orientador**

---

Prof. Dr. Arlindo de Alencar Araripe Moura  
Universidade Federal do Ceará  
**Examinador**

## DEDICATÓRIA

A todos os que acreditaram e me  
acompanharam nesta jornada do mestrado.  
Em especial à minha tia Maria Anete Gomes,  
à minha mãe Armênia Gonçalves Rocha, e ao meu  
grande companheiro Lincoln Viana Rodrigues.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre me guiar, ensinar e mostrar-me que tudo posso naquele que me fortalece.

À Universidade Estadual do Ceará, pela oportunidade de ampliar os meus conhecimentos e realizar mais esse sonho.

À CAPES, pelo apoio financeiro durante toda essa caminhada acadêmica de mestrado.

À minha grande mãe, Armênia Gonçalves Rocha, que sempre me apoiou e fortaleceu em todos os momentos fáceis e difíceis, e quem eu amo muito.

À minha tia, Maria Anete Gomes, que foi fundamental para a formação da base dos meus conhecimentos e que eu tanto amo, e à minha prima-irmã, Thatianny Gomes, que sempre me incentivou e torceu por mim.

À minha co-orientadora, Profa. Lúcia Daniel Machado da Silva, por me receber em seu laboratório e orientar-me com muito carinho e paciência ao longo dessa grande caminhada, além de me ensinar muito profissionalmente e pessoalmente.

Ao meu orientador do coração, Prof. Ricardo Toniolli, que abriu as portas para mim em seu laboratório e muito me ensinou, sempre paciente e atencioso.

Ao Prof. Airton Alencar de Araújo, pela sua atenção e ajuda em problemas estatísticos e práticos.

Ao Laboratórios de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino e aos membros, pelo o apoio em meu projeto e pela concessão no uso de equipamentos e, espaço físico para a realização dos experimentos.

Aos membros do Laboratório de Reprodução de Carnívoros, Janaína de Fátima Saraiva Cardoso, Carlos Gabriel Almeida Dias, Barbara Sucupira Pereira, Cyntia Levi Baratta Monteiro, Henna Roberta Quinto, Juliana da Silva Araújo, Luana Azevedo Freitas, Alberto

Rocha Girão Júnior, Carla Melo Ferreira, Ticiana Franco Pereira da Silva, Daniel Couto Uchoa, Victor Leão Hitzschky Madeira, Ricardo Parente Jucá e Ângela Cristina de Oliveira, por terem me recebido com carinho e auxiliado em minha pesquisa.

Ao meu namorado e companheiro, Lincoln Viana Rodrigues, pelo seu apoio, incentivo, paciência, compreensão, companheirismo e amor. Por ser essa pessoa maravilhosa com quem posso contar em todos os momentos e que eu amo muito.

À minha grande amiga, Darlete Matos, por ser meu braço direito nas jornadas de trabalho, pela paciência a mim destinada e pela sua grande amizade que é muito valiosa.

Às pessoas do PPGCV, pelo auxílio e orientação durante o mestrado.

Àqueles que fazem parte do Laboratório de Reprodução e Tecnologia do Sêmen Suíno, Prof. Ricardo Toniolli, Prof. Airton de Alencar Araújo, Darlete Matos, Maria Rocilda de Oliveira, Tabosa, Francisco Alcício Albano e Eliude Araújo Barbosa.

À minha amiga Cláudia da Cunha Barbosa, pela sua ajuda, incentivo e amizade que muito me ajudaram nessa caminhada.

À minhas amigas, Nadja Vila Nova e Danielle Araújo, que me acompanharam ao longo dessa jornada e deram muita força.

À Granja Regina, pelo incentivo dado a pesquisa, permitindo o uso de seus animais, e aos seus integrantes sempre muito dedicados Sr. Carlos Braga, Elizete Vieira de Sousa e Raimundo Nonato Alves.

**‘ Vós sois a Luz do mundo brilhe a vossa Luz ’**

Jesus

## RESUMO

Estudos mostram que o íon cálcio é muito importante para regulação da motilidade espermática. Desta forma, este trabalho foi dividido em dois experimentos, tendo como objetivos: 1) Avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações dos íons cálcio no diluidor BTS para sêmen suíno sobre a qualidade dos espermatozoides suínos mantidos resfriados; 2) Avaliar se os diferentes tipos e concentrações de íons cálcio no diluidor BTS para sêmen suíno podem promover a hiperativação espermática. O sêmen foi coletado de varrões e seus parâmetros analisados. Para o primeiro experimento, foram utilizados 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, distribuídos em diferentes concentrações: 0 mM – controle; 0,4mM; 4mM; 40mM e 400mM. Para o segundo, foram usados os mesmos diferentes tipos de cálcio diluídos em BTS para as concentrações: 0 mM – controle; 0,4mM e 4mM. As amostras foram armazenadas a 17°C, elevando-se a temperatura a 37°C para a avaliação subjetiva do vigor e motilidade espermática (experimento 1) e avaliação objetiva computadorizada (experimento 2), realizadas do D0 até D2. Os testes de viabilidade espermática (experimento 1 e 2) e morfologia (experimento 2) foram realizados no D0 e D2. No experimento 1, verificou-se que a adição dos sais de cálcio gerou, a partir do primeiro dia, alterações no vigor e na motilidade dos espermatozoides suínos e não exerceu efeito negativo sobre a membrana espermática, ressaltando-se que os valores de vigor dessas amostras caracterizam movimentos circulares e desorganizados, o que pode estar relacionado à hiperativação. No experimento 2, os resultados para a concentração de 4 mM ( $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$ ) 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 ( $\leq 35\%$ ). Assim, concluiu-se que a adição de 4 mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  gerou a hiperativação das células espermáticas e que não exerceu efeito negativo sobre a membrana espermática.

**Palavras-chave:** Espermatozóide; cálcio; motilidade, hiperativação.

## ABSTRACT

Studies show that the calcium ion is very important for regulation of sperm motility. Thus, this work was divided into two experiments, with the objectives: 1) assess the effect of different types and concentrations of calcium ions in BTS extender for boar semen on the quality of spermatozoa boars kept cold, 2) assess whether the different types and concentrations of calcium ions in BTS extender for boar semen can promote sperm hyperactivation. The semen was collected from boars and their parameters examined. For the first experiment, we used different types of calcium diluted in BTS: calcium carbonate, calcium hydroxide, anhydrous dibasic calcium phosphate, hydrated calcium sulfate and calcium sulfate anhydrous, distributed in different concentrations: 0 mM - control, 0.4 mM; 4 mM; 40mM and 400mM. For the second, they were used different types of calcium diluted in BTS for concentrations: 0 mM - control, 0.4 mM and 4 mM. The samples were stored at 17°C, increasing the temperature at 37°C for the subjective evaluation of the force and sperm motility (experiment 1) and objective assessment computed (experiment 2), made the D0 to D2. Tests for sperm viability (experiment 1 and 2) and morphology (experiment 2) were made in the D0 and D2. In experiment 1, it was found that the addition of calcium salts generated from the first day, changes in the force and motility of sperm and no pigs had negative effect on the sperm membrane, emphasizing that the values of such force samples characterize circular movements and disorganized, which may be related to hyperactivation. In experiment 2, the results for the concentration of 4 mM ( $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CaSO}_4$ ) indicated an increase in average speed of trajectory ( $\geq 40 \mu\text{m} / \text{s}$ ) and the frequency of cross beat ( $\geq 8.0 \text{ Hz}$ ), in addition to reduction of linearity ( $\leq 35\%$ ). Thus, it was concluded that the addition of 4 mM  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  and  $\text{CaSO}_4$  generated by hyperactivation of sperm cells and not exerted negative effect on the sperm membrane

**Keywords:** Spermatozoa; calcium; motility; hyperactivation

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	: Porcentagem
$\mu\text{m/s}$	: Micrômetros por segundo
<	: Menor
>	: Maior
$\pm$	: Mais ou menos
$\leq$	: Menor ou igual
$\geq$	: Maior ou igual
$^{\circ}\text{C}$	: Graus Celsius
A23187	: Ionóforo de cálcio
ABP	: Proteína ligadora de andrógeno
ALH	: Amplitude de deslocamento lateral da cabeça
AMPC	: Sinalizador intracelular específico – AMP cíclico (com Adenina)
ATP	: Adenosina tri-fosfato
BCF	: Frequência de batimento cruzado
BTS	: <i>Betsville Thawing Solution</i>
$\text{Ca}^{2+}$	: Íon cálcio
$\text{CaCO}_3$	: Carbonato de cálcio
$\text{CaCl}_2$	: Cloreto de cálcio
$\text{CaHPO}_4$	: Fosfato dibásico anidro de cálcio
$\text{Ca(OH)}_2$	: Hidróxido de cálcio
CAPES	: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CASA	: Análise de sêmen auxiliada por computador
$\text{CaSO}_4$	: Sulfato anidro de cálcio
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	: Sulfato diidratado de cálcio
C.M.	: Campo do microscópio
CNCs	: Canais nucleotídeos cíclicos
cm	: Centímetro
CNPq	: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico
FAVET	: Faculdade de Veterinária

FSH	: Hormônio folículo estimulante
FUNCAP	: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico
g	: Gramas
GMPc	: Sinalizador intracelular específico – AMP cíclico (com Guanina)
GLM	: <i>General Linear Model</i> (Modelo Linear Geral)
GnRH	: Hormônio liberador de gonadotrofinas
Hz	: Hertz
IA	: Inseminação artificial
IP <sub>3</sub>	: Inositol 1,4,5-trifosfato
IP <sub>3</sub> R	: Receptor inositol 1,4,5-trifosfato
LIN	: Linearidade
LH	: Hormônio luteinizante
LRC	: Laboratório de Reprodução de Carnívoros
LRSTS	: Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen
LTSCO	: Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino
Mg <sup>2+</sup>	: Íon magnésio
mL	: Mililitros
mM	: Milimolar
mOsm	: Miliosmol
MPCA	: Canal transportador cálcio-calmodulina dependente de ATPase
SCA	: <i>Sperm Class Analyser</i> (Analisador de semen)
SEM	: Erro padrão da média
sptz	: Espermatozóide
sptz/mL	: Espermatozóides por mililitro
STR	: Retilinearidade
UECE	: Universidade Estadual do Ceará
VAP	: Velocidade média da trajetória
VSL	: Velocidade linear progressiva
x	: vezes
WOB	: Oscilação
μL	: Microlitro

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	Página
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	
<b>Quadro 1.</b> Parâmetros de classificação das características espermáticas – Análise subjetiva.....	15
<b>Quadro 2.</b> Parâmetros da motilidade espermática obtidos por meio da CASA.....	17
<b>Figura 1.</b> Velocidades obtidas pelo sistema CASA. VAP: velocidade média da trajetória; VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade linear progressiva.....	17
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Quadro 1.</b> Constituição dos tratamentos de cálcio em função da concentração e do período de conservação.....	27
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Figura 1.</b> Constituição dos tratamentos de cálcio em função da concentração e do período de conservação.....	43

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>Tabela 1.</b> Valores médios $\pm$ SEM para motilidade (%) e vigor espermático (1 a 5) das amostras com diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.....	29
<b>Tabela 2.</b> Valores percentuais médios $\pm$ SEM para espermatozóides vivos das amostras nas diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.....	32
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>Tabela 1:</b> Valores percentuais médios $\pm$ SEM para os espermatozóides móveis das amostras com diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio .....	47
<b>Tabela 2:</b> Valores médios $\pm$ SEM para VAP (velocidade média da trajetória), LIN (linearidade) e BCF (frequência de batimento cruzado) das amostras com diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.....	48
<b>Tabela 3:</b> Valores percentuais médios $\pm$ SEM para espermatozóides vivos das amostras nas diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.....	50
<b>Tabela 4:</b> Valores percentuais médios $\pm$ SEM de espermatozóides normais das amostras nas diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.....	51

## SUMÁRIO

RESUMO.....	ix
ABSTRACT.....	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Anatomofisiologia do varrão.....	3
2.2. Conservação do sêmen suíno.....	4
2.3. Íon cálcio.....	6
2.4. Mecanismo de ação do cálcio na célula espermática.....	7
2.5. Hiperativação.....	11
2.6. Sistema de análise seminal.....	14
2.6.1. Análise subjetiva.....	14
2.6.2. Análise objetiva.....	16
3. JUSTIFICATIVAS.....	19
4. HIPÓTESES CIENTÍFICAS.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
5.1. Objetivo Geral.....	21
5.2. Objetivos Específicos.....	21
6. CAPÍTULO 1. Efeito das concentrações de íons cálcio no sêmen suíno resfriado....	22
7. CAPÍTULO 2. Avaliação computadorizada do efeito das concentrações de íons cálcio no sêmen suíno resfriado: Hiperativação.....	38
8. CONCLUSÕES.....	56
9. PERSPECTIVAS.....	57
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
11. ANEXOS.....	70

## 1. INTRODUÇÃO

Há alguns anos, os conceitos sobre manejo reprodutivo em suinocultura eram muito diferentes dos que se conhece e aplica atualmente. Os novos conceitos têm como finalidade obter alta fertilidade (acima de 90%), assim como alta prolificidade (acima de onze leitões nascidos vivos) (CORRÊA et al., 2001).

No Brasil, a transformação tecnológica da suinocultura ocorreu juntamente com a implantação dos primeiros programas de inseminação artificial. Esta biotécnica possibilita a disseminação acelerada do material genético de animais superiores, ou seja, de varrões com excelentes características genéticas, reprodutivas e produtivas (qualidade e quantidade de sêmen que produzem) (BORTOLOZZO et al., 2005).

Assim, para a aplicação desta biotécnica, os parâmetros de qualidade a serem considerados no ejaculado do varrão consistem em determinar: volume, aspecto, odor, coloração, concentração, vigor, morfologia e motilidade espermática (CORRÊA et al., 2001).

Alguns estudos mostram que a inclusão de íons  $\text{Ca}^{2+}$  nos diluidores de sêmen tem um papel especial na regulação da motilidade espermática de vertebrados e invertebrados. Alguns resultados sugerem que o cálcio extracelular é indispensável para a ativação da motilidade espermática, além de ser um pré-requisito para o quimiotactismo celular (YOSHIDA et al., 1994).

Em mamíferos, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular regulam a fertilização através da participação em muitos eventos, incluindo hiperativação da motilidade espermática, reação acrossômica, fusão espermatozóide-oócito e ativação do oócito (SUAREZ et al., 1993). Também afirma-se de acordo com MARQUEZ et al. (2007) que a elevação deste íon está associada ao processo de capacitação espermática.

Considera-se que a motilidade hiperativada, um padrão movimento flagelar apresentado por espermatozoides de mamíferos no oviducto, é essencial para a fertilização *in vivo* (HO et al., 2002) e *in vitro* (SUAREZ et al., 1993).

A melhoria na velocidade espermática causada pelo cálcio é instantânea. Assim, a adição de cálcio ao diluidor de sêmen poderia aumentar a capacidade de fertilização dos espermatozoides em fertilização *in vitro* ou em processos de transferência de gametas intrafalopianos.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Anatomofisiologia do varrão

O sistema reprodutivo do macho é composto por diferentes estruturas incluindo: hipotálamo, glândula pituitária (hipófise), testículos, sistema de ductos urogenitais e glândulas sexuais anexas. Estas estruturas se comunicam via sistema endócrino e nervoso para controlar a atividade reprodutiva dos machos. A função testicular normal requer estímulo hormonal das gonadotrofinas hipofisárias: LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio do folículo estimulante), que, por sua vez, são controladas pela secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) do hipotálamo. Trata-se do eixo Hipotálamo-hipófise-gonadal. Outros hormônios hipofisários (por exemplo: prolactina, hormônio do crescimento e hormônios estimulantes da tireóide) podem ter papéis secundários no suporte da função testicular (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

Os testículos localizam-se no escroto, região perineal. Eles têm como função a produção de espermatozoides e hormônios (o principal andrógeno, testosterona, e hormônios esteróides). São compostos de túbulos seminíferos onde são produzidos os espermatozoides. As células de Sertoli, encontradas revestindo a luz dos túbulos seminíferos, são responsáveis pela produção de: a) estrogênio: encontrado em grande quantidade no sêmen, devido à conversão de testosterona em estrogênio pelas células de Sertoli, por meio da enzima aromatase; b) inibina: importante para regulação das gonadotrofinas no macho; c) Proteína ligadora de andrógeno (ABP): facilita a entrada de testosterona do tecido intersticial para dentro dos túbulos, sob influência do FSH, estando envolvida na maturação dos espermatozoides e produção de hormônios. As células de Leydig, responsáveis pela produção de testosterona em resposta ao estímulo do LH, são encontradas em grande quantidade em machos suínos. Estas células, nervos, vasos linfáticos e sanguíneos estão localizados entre os túbulos seminíferos (CORRÊA et al., 2001).

Os túbulos seminíferos são contínuos com túbulos retos, que se conectam a *rede testis* (rede testicular). A rede testicular une-se aos ductos eferentes, os quais finalmente formam o ducto do epidídimo, um tubo enovelado que, com tecido conjuntivo e muscular, forma a cabeça, corpo e cauda. O epidídimo tem como principais funções: armazenamento e maturação dos espermatozoides, e também serve como via de transporte aos espermatozoides

até os ductos deferentes. O ducto deferente é um tubo por onde os espermatozóides são transportados da cauda do epidídimo até a uretra pélvica (HAFEZ e HAFEZ, 2004). Adjacente à uretra pélvica existem três glândulas anexas, que secretam o fluido e o gel que compreendem 90% do volume do ejaculado. No macho suíno, essas glândulas são: vesículas seminais que são grandes e menos compactas, responsáveis pela produção da maioria dos fluidos do sêmen suíno usados como substratos energéticos (pouca frutose e grandes quantidades de ergotioneína e inositol); glândula prostática tem a função de neutralizar a acidez das secreções vaginais e dar as características de odor ao sêmen; glândulas bulbouretrais são grandes nos machos suínos e secretam a fração gelatinosa, que é característica do seu ejaculado. A porção terminal do sistema urogenital é a uretra peniana, a estrutura central do pênis. O pênis suíno é do tipo fibro-elástico e possui a sua porção final (glande) espiralada. O prepúcio, acessível a palpação digital, é onde urina, sêmen e outras secreções podem se acumular (CORRÊA et al., 2001).

O caminho que os espermatozóides percorrem desde as vias mais internas até a saída do sêmen por meio do ejaculado é: túbulos seminíferos, túbulos retos e rede testicular (vias intratesticulares) → ducto do epidídimo → ducto deferente → uretra (vias extratesticulares).

A produção diária de espermatozóides pode ocorrer em ritmo constante, da mesma forma que o volume do ejaculado. Para um reprodutor suíno com uma idade média de oito a doze meses, essa produção diária é de  $9,5 \times 10^9$  espermatozóides/mL e para um reprodutor adulto (doze meses) essa produção chega a  $17 \times 10^9$  espermatozóides/mL (LIMA, 2006). Geralmente, o volume normal do ejaculado de um macho suíno adulto varia de 50 a 500mL (BORTOLOZZO et al., 2005), com um volume médio de 240 a 250mL (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

## **2.2 Conservação do sêmen suíno**

O espermatozóide do varrão apresenta muita sensibilidade, tanto ao envelhecimento, quanto ao choque térmico, devido à fragilidade do seu acrossomo. De maneira geral, a conceituação da qualidade do sêmen suíno após a conservação reside no número de espermatozóides com integridade do acrossomo e no percentual de formas dotadas de motilidade. Esta circunstância se relaciona com a particularidade do metabolismo do espermatozóide suíno o qual necessita de oxigênio para sua ativação (MIES FILHO, 1987).

A temperatura de conservação aconselhada varia de um modo amplo de 4 - 5° a 20 - 22°C. No entendimento de alguns autores, a temperatura de 4 - 5°C seria a mais favorável, por impedir a proliferação de germes. A refrigeração do sêmen à temperatura de 4 - 5° C pode colaborar para uma expansão ainda maior da técnica de inseminação artificial (IA), principalmente em regiões onde predominam temperaturas elevadas durante todo o ano. A possibilidade de refrigerar o sêmen nessa temperatura, em refrigeradores comuns, torna o uso da IA de maior aplicabilidade a partir de uma considerável redução dos custos para as granjas (CÔRREA et al., 2001). Entretanto, a sensibilidade especial do espermatozóide da espécie suína às modificações térmicas recomendam a utilização de temperaturas mais altas do que 15°C (MIES FILHO, 1987).

Na técnica praticada normalmente para conservação do sêmen suíno, utiliza-se uma temperatura de 15 a 18° C , que constitui uma ótima temperatura de conservação para evitar problemas de motilidade reduzida, morfologia entre outros. Normalmente se utiliza diluidores de curta duração, como o BTS - *Betsville Thawing Solution* . Nesse caso, a viabilidade do sêmen decresce a partir das 72 horas após a diluição, com reflexos negativos sobre os índices reprodutivos. Os diluidores normalmente utilizados para acondicionar sêmen (15-18° C), não permitem acondicionar sêmen à 5° C, pelas injúrias sofridas pelo mesmo, principalmente quanto à motilidade e morfologia (CÔRREA et al., 2001).

Com a temperatura de 15 a 18° C, há uma redução no metabolismo dos espermatozóides, que exigem menos nutrientes e, conseqüentemente, produzem menos subprodutos (produtos tóxicos resultantes do metabolismo) (CÔRREA et al., 2001).

A redução da temperatura tem sido um método utilizado para prolongar a viabilidade dos espermatozóides ejaculados, devido ao seu efeito de desaceleração dos processos metabólicos celulares (BORTOLOZZO et al., 2005). O fato de que baixas temperaturas de armazenamento prolongam a duração da motilidade foi demonstrado em aves (GIESEN e SEXTON, 1983), bovinos (FOOT e BRATTON, 1960) e humanos (APPELL et al., 1977). Entretanto, o espermatozóide suíno é, particularmente, muito sensível ao resfriamento (LEEuw et al., 1991). Um resfriamento até temperaturas inferiores à 15°C resulta em redução da taxa de sobrevivência espermática. Este fenômeno é atribuído a alterações estruturais e bioquímicas que levam à ruptura da membrana plasmática, degeneração do acrossomo e perda

permeabilidade seletiva da membrana, com perda de íons e enzimas (LEEuw et al., 1991). Com isso o armazenamento do sêmen suíno fica restrito à temperaturas superiores a 15°C. A temperatura ideal para o armazenamento do sêmen suíno diluído é de 16 a 17°C. Este pode ser armazenado em refrigeradores adaptados para atingir esta temperatura (BORTOLOZZO et al., 2005).

### **2.3 Íon cálcio**

O cálcio é um metal iônico abundante e um dos mais importantes elementos constitucionais do organismo e da fisiologia celular. Cerca de 90% do cálcio corporal é encontrado nos dentes e ossos. A fração restante encontra-se envolvida em processos fisiológicos de excitação, crescimento, locomoção celular, estabilidade da membrana plasmática, comunicação intercelular, fusão de membranas, processos de transportes intracelulares e fertilização. O íon cálcio pode atuar, tanto no meio intracelular, como extracelular, depende do seu sítio de ação (GILMAN et al., 1991).

Desde que seu papel na contração muscular foi identificado há 100 anos atrás, o cálcio tem sido mostrado como o segundo mensageiro intracelular e que é importante em inúmeras outras funções incluindo divisão celular, diferenciação, motilidade celular (YANAGIMACHI e USUI, 1974; HONG et al., 1984; PRIEN et al., 1990; BERRIDGE et al., 2000; BOOTMAN et al., 2001; DOWDEN et al., 2006) e apoptose (ALBERTS et al., 2004).

Altos níveis de cálcio dentro da célula são tóxicos (ALBERTS et al., 2004), por isso uma regulação é necessária. Os eucariotos têm desenvolvido numerosos sistemas que expulsam o íon para fora da célula ou armazenam-no em compartimentos especializados (WITHERS et al., 2006). Em muitas células, o  $\text{Ca}^{2+}$  tem maior função sinalizadora quando está em concentrações elevadas no compartimento citosólico (BERRIDGE, 1993).

O  $\text{Ca}^{2+}$  e o AMP cíclico funcionam como mediadores intracelulares pequenos, pequenas moléculas de sinalização intracelular, são hidrossolúveis e difundem-se no citosol. Eles transmitem o sinal por se ligarem a proteínas de sinalização específicas ou proteínas-alvo e alterarem seu comportamento. O  $\text{Ca}^{2+}$  é mais amplamente utilizado como mediador intracelular do que o AMP cíclico (ALBERTS et al., 2004). Ainda pode ressaltar que existem nos espermatozoides humanos relações inversas entre o estímulo da motilidade pelo AMPc

(motilidade ativada – progressiva) e modulação da motilidade produzida pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (motilidade hiperativada) (TASH e BRACHO, 1994).

A concentração desse íon no citosol é mantida em níveis muito baixos ( $10^{-4}$  mM), enquanto é alta no líquido extracelular (1-2 mM) e no lúmen do retículo endoplasmático. Assim, existe um gradiente através da membrana plasmática tendendo a conduzir o íon para o citosol. Quando o sinal abre temporariamente os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  na membrana, o íon migra para o citosol, aumentando de 10 a 20 vezes sua concentração local e estimulando as proteínas celulares (ALBERTS et al., 2004).

Este íon desempenha um papel muito importante na regulação da motilidade espermática, principalmente no momento da fertilização (MARQUEZ et al., 2007). 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).

## **2.4 Mecanismo de ação do cálcio na célula espermática**

O íon cálcio tem um papel regulador no controle da motilidade e do metabolismo energético do espermatozóide. Após a ejaculação, os espermatozóides passam por um processo de capacitação, e a reação acrossômica é acompanhada pelo aumento da concentração intracelular de cálcio. 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 espermatozóides (DARSZON et al., 1999).

O  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular não muda na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  externo, mas uma subsequente adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio causa um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e da motilidade espermática (KRASZNAI et al., 2000). Os resultados de KRASZNAI et al (2000) indicam que o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e o resultante aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular são os eventos desencadeadores da iniciação da motilidade dos espermatozóides de peixe carpa.

Estudos das relações entre cálcio e os parâmetros do sêmen são controversos. PRIEN e colaboradores (1990) mostraram que o  $\text{Ca}^{2+}$  no sêmen do homem diminui significativamente com a redução da motilidade (< 60%), cujo total de cálcio não foi diferente para homens com

sêmen com motilidade normal. HONG e colaboradores (1984) mostraram que o cálcio tem um efeito desfavorável na motilidade dos espermatozóides ejaculados. NISHIDA e colaboradores (1996) mostraram que a exposição *in vitro* de espermatozóides humanos a baixas concentrações de cálcio aumenta a capacidade fertilizante.

Os canais iônicos são elementos chaves na comunicação entre o espermatozóide e o oócito. Mudanças de permeabilidade iônica no espermatozóide regulam a motilidade espermática, o quimiotactismo e a reação acrossômica (DARSZON et al., 1999). Os tipos principais de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  são:

1. Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  dependentes de voltagem se abrem, na membrana plasmática, em resposta à despolarização e permitem a entrada do íon (ALBERTS et al., 2004): canais potencial – dependente (CATTERAL et al., 1995) e receptor – operado (PITCHER et al., 1998), trocas de sódio – cálcio (VINES et al., 2002), canais nucleotídeos cíclicos (CNCs) (WIESNER et al., 2007), canais de  $\text{Ca}^{2+}$  reserva-operados (PUTNEY, 1986; PUTNEY, 1990), canal transportador cálcio-calmodulina dependente de ATPase (MPCA) (CARAFOLI, 1987; BLAUSTEIN e LEDERER, 1999) e família CatSper (CARISON et al., 2003).

2. Os canais de liberação de  $\text{Ca}^{2+}$  com portões inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) que permitem a saída e entrada do íon do retículo endoplasmático e do acrossomo, nos espermatozóides (ALBERTS et al, 2004).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem-receptor-operados são proteínas transmembranárias que se abrem em resposta à despolarização da membrana e permitem a entrada de íons  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular para o interior da célula (CATTERALL et al., 2003).

Os canais nucleotídeos cíclicos (CNCs) são canais catiônicos controlados por nucleotídeos cíclicos como AMPc ou GMPc (ALBERTS et al, 2004). A presença de CNCs em espermatozóides de mamíferos foi suposta desde que os níveis de AMPc e  $\text{Ca}^{2+}$  são importantes moduladores da motilidade (também da capacitação e reação acrossômica) (DARSZON et al., 1999). Os CNCs dos espermatozóides são permeáveis ao  $\text{Ca}^{2+}$  e mais sensíveis ao GMPc do que ao AMPc. Os vários tipos de CNCs têm diferentes permeabilidades para o  $\text{Ca}^{2+}$  e são distintamente localizados no flagelo (WIESNER et al., 2007). Nos espermatozóides de vertebrados e invertebrados, muitos processos celulares são regulados por

nucleotídeos cíclicos e  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (ARNOULT et al., 1996). Assim, os CNCs podem auxiliar muitas funções incluindo quimiotactismo, exocitose acrossomal e motilidade (WIESNER et al., 2007).

CatSper representa uma única classe de canal iônico pulsátil proteico, ou seja, canal potencial-dependente (REN et al., 2001; CARLSON et al., 2003; QUILL et al., 2003; KIRICHOK et al., 2006). É também o único cátion canal proteico, localizado na peça intermediária do flagelo (CARLSON et al., 2003), requerido para a motilidade espermática normal, em particular para a penetração espermática na zona pelúcida (REN et al., 2001).

A ativação da CatSper promove o aumento da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular na cauda espermática. O aumento do nível de  $\text{Ca}^{2+}$  regula a motilidade espermática, através das proteínas motoras na cauda (REN et al., 2001).

O fato de que a CatSper é expressada somente em células germinativas masculinas – especificamente, na cauda de espermatozóides maduros - tem fortalecido a sugestão de que ela está envolvida na regulação da motilidade espermática (GARBERS, 2001). Espermatozóides de camundongos deficientes em CatSper falharam na aquisição da motilidade hiperativada (REN et al., 2001).

Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  reserva-operados estão localizados na membrana plasmática e mediam a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  quando as reservas de internas estão esgotadas devido a ação do  $\text{IP}_3$  ou sinais liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  (PUTNEY, 1986; PUTNEY, 1990).

Os canais MPCA pertencem à família de canais voltagem-ATPase que permitem o transporte ativo do íon através da membrana plasmática (WITHERS et al., 2006) e são essenciais para a fertilidade (SCHUH et al., 2004). Os MPCA são restritos à membrana plasmática da cauda de espermatozóides de bovinos e camundongos (WENNEMUTH et al., 2003). A calmodulina é uma proteína de ligação a  $\text{Ca}^{2+}$  que serve como transdutor do sinal de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ela funciona como um receptor intracelular polivalente de  $\text{Ca}^{2+}$ , mediando muitos processos regulados pelo  $\text{Ca}^{2+}$  (DEDMAN et al., 1977; CHEUNG, 1980; ALBERTS et al., 2004). O complexo  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina atua por se ligar a outras proteínas. Entre os alvos regulados pela calmodulina estão muitas enzimas e proteínas de transporte de membrana (ALBERTS et al., 2004).

O mensageiro intracelular inositol 1,4,5-trifosfato ( $IP_3$ ) é produzido pela hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato ( $PIP_2$ ) (BERRIDGE e IRVINE, 1984; ALBERTS et al., 2004). O  $IP_3$  é altamente mobilizado no citoplasma e difundido para o interior da célula (ALLBRITTON et al., 1992) onde são encontrados receptores específicos ( $IP_3R$ ) no acrossomo. A ligação do  $IP_3$  muda a conformação dos  $IP_3R$  de modo que o canal seja aberto, permitindo a saída e entrada de  $Ca^{2+}$  no acrossomo (BOOTMAN et al., 2001; KHAN et al., 2001). Os receptores de  $IP_3$  foram claramente localizados no acrossomo dos espermatozóides de camundongos, hamster e cachorro, sugerindo que o acrossomo funciona como uma reserva interna de cálcio (WALENKY e SNYDER, 1995; KURODA et al., 1999).

De acordo com WALENSKY e SNYDER (1995), o  $IP_3$  regula o aumento de  $Ca^{2+}$  com a participação do acrossomo na indução da reação acrossômica e hiperativação do espermatozóide. Os efeitos de  $IP_3$  podem ser mimetizados pelo uso de um ionóforo de  $Ca^{2+}$ , como o A23187 ou a ionomicina, que permite a entrada de  $Ca^{2+}$  do líquido extracelular para o citosol.

Os ionóforos são pequenas moléculas hidrofóbicas que se dissolvem em bicamadas lipídicas e aumentam sua permeabilidade a íons inorgânicos específicos. Eles permitem o movimento líquido dos íons somente a favor dos seus gradientes eletroquímicos (ALBERTS et al., 2004).

O A23187 é um exemplo de carreador de íon móvel que transporta íons divalentes, como o  $Ca^{2+}$  e o  $Mg^{2+}$  (SIMPSON et al., 1987). Quando as células são expostas a A23187, o  $Ca^{2+}$  do fluido extracelular penetra no citosol a favor de acentuado gradiente eletroquímico. Esse ionóforo é amplamente utilizado para aumentar a concentração de  $Ca^{2+}$  livre no citosol (ALBERTS et al., 2004).

Espermatozóides de mamíferos, como outras células eucarióticas, usam sinais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) para controle de respostas fisiológicas. O influxo de  $Ca^{2+}$  é considerado um regulador importante para a motilidade espermática, um participante da capacitação e um elemento essencial para o início da reação acrossômica (BABCOCK e PFEIFFER, 1987; DARSZON et al., 1999). A motilidade é uma função importante para os espermatozóides e é usada como um indicador na qualidade do sêmen (APARICIO et al., 2005).

## 2.5 Hiperativação espermática

O cálcio é um íon crítico para a fisiologia espermática (MICERA et al., 2008). A elevação da concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  é importante para o desenvolvimento da fisiologia espermática que precede a fertilização e para a motilidade ativada e hiperativada dos espermatozoides (TURNER, 2006).

Durante a maturação espermática, a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  aumenta em muitas espécies (BALDI et al., 1991), conduzindo a uma motilidade hiperativada (WHITE et al., 1989) e reação acrossômica espontânea (BABCOCK e PFEIFFER, 1987; DARSZON et al., 1999).

Espermatozoides de muitas espécies de mamíferos sofrem mudanças no tipo de motilidade flagelar, de progressiva, motilidade linear, para menos progressiva, menos linear e mais vigorosa, a motilidade hiperativada (ROBERTSON et al., 1988).

A motilidade hiperativada foi primeiramente descrita por YANAGIMACHI (1969, 1970), realizando estudos com espermatozoides epididimários de hamster, subsequentemente, em outras espécies de mamíferos (FRASER, 1977). YANAGIMACHI (1969, 1970) observou que espermatozoides de hamster incubados em fluido folicular ou soro exibiam um vigoroso movimento caracterizado por alta amplitude de batimento flagelar. Ele chamou este movimento de ativação, mas depois mudou o termo para hiperativação para distinguir da motilidade inicial dos espermatozoides no epidídimo ou vasos deferentes.

Essa motilidade 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 oviducto, dependendo da espécie. O íon  $\text{Ca}^{2+}$  tem mostrado-se como crucial para iniciação e manutenção da motilidade hiperativada (HO e SUAREZ, 2001). Essa motilidade é caracterizada pela alta amplitude de inclinação flagelar, batimentos flagelares assimétricos, e trajetória circular ou irregular (SUAREZ, 1996). Os espermatozoides de ejaculado a fresco nadam com baixa amplitude e batimentos flagelares simétricos ao longo da trajetória que é quase linear (SUAREZ et al., 1983).

A hipertivação tem sido caracterizada por uma variada amplitude de batimento flagelar, marcada pelo deslocamento lateral da cabeça, trajetória *star-spin* (girar em rotação) e é considerada uma parte integral da capacitação precedente da ligação do espermatozóide na zona pelúcida e da ocorrência da reação acrossômica (YANAGIMACHI, 1970). ROBERTSON e colaboradores (1988) concluíram em seus resultados utilizando espermatozóides humanos que as mudanças na motilidade flagelar, especialmente a ocorrência de motilidade hipertivada, precede a ocorrência da reação acrossômica em espermatozóides livres e nadantes.

O padrão assimétrico de movimento flagelar foi induzido em espermatozóides desmembranados e membrados de ouriço do mar quando a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio foi elevada (BROKAW, 1991). Um semelhante batimento flagelar assimétrico foi observado em espermatozóides de *Ciona* (BROKAW, 1997). O movimento curvilíneo observado nas ascídeas pode ser derivado do movimento assimétrico  $\text{Ca}^{2+}$ -induzido do flagelo espermático e é considerado responsável pelo quimiotactismo espermático (YOSHIDA et al., 2002).

Pode-se dizer que a motilidade hipertivada representa um aumento da força do batimento flagelar espermático em resposta ao aumento da viscosidade. Isto é uma vantagem mecânica conferida ao espermatozóide, que teria sua passagem facilitada através do oviducto e da zona pelúcida do oócito (SUAREZ et al., 1991).

SUAREZ E DAI (1992) concluíram que espermatozóides de camundongos foram capazes de penetrar no meio viscoelástico mais efetivamente depois de hipertivados. Assim, a hipertivação seria uma vantagem para o movimento dos espermatozóides por meio do fluido viscoso do oviducto, muco viscoelástico do oviducto e matrix viscoelástica do *cumulus*. O meio utilizado para hipertivação dos espermatozóides continha 2,5mM de  $\text{CaCl}_2$ .

STAUSS e colaboradores (1995) utilizaram um meio de capacitação que continha 2,4mM de  $\text{CaCl}_2$ . Também demonstraram que a hipertivação de espermatozóides de camundongos foi suprimida após ter sido iniciada por meio do uso de antagonistas dos canais de cálcio, por exemplo o Cádmiu, e que ela ofereceu vantagem na penetração da zona pelúcida do oócito.

De acordo com WIESNER e colaboradores (2007) a adição de  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio, cerca de 2mM causa um aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular e da motilidade espermática (KRASZNAI et al., 2000; HO et al., 2002). A concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular é maior na cabeça e na cauda dos espermatozóides de hamster hiperativados quando comparada com espermatozóides ativados no mesmo tempo e na mesma amostra (SUAREZ e DAI, 1995). O aumento da concentração na cauda é maior do que na cabeça, isto seria porque o principal local de influxo de cálcio para a hiperativação é na cauda (SUAREZ e DAI, 1995). Os resultados de KRASZNAI et al (2000) indicam que o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  da membrana plasmática e o resultante aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular são os eventos desencadeadores da iniciação da motilidade dos espermatozóides de peixe carpa.

Assim, estudos mostraram que o  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular é requerido para a manutenção da hiperativação em espermatozóides de camundongos (YANAGIMACHI, 1982), e o mecanismo de aumento do cálcio intracelular no espermatozóide envolve a abertura de canais de cálcio da membrana plasmática, porque a hiperativação é interrompida quando canais de cálcio são bloqueados por antagonistas (STAUSS, 1995). Trabalhos mostraram que espermatozóides apresentavam falhas na motilidade ao longo do tempo na ausência de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular (HEFFNER e STOREY, 1981; CHINOY et al., 1983).

A entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula espermática através dos canais de  $\text{Ca}^{2+}$  voltagem serve como um segundo mensageiro de sinalização elétrica, iniciando eventos intracelulares incluindo contração, motilidade hiperativada, secreção, neurotransmissão e regulação de enzimas ativadas e expressão de genes (CATTERALL, 2000). A atividade do canal de cálcio flagelar é potencializada pela alcalinização intracelular, ou seja, aumento do  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (KIRICHOK et al., 2006).

A hiperativação tem sido associada com o alcance da capacidade para fertilização *in vitro* (SUAREZ et al., 1993). BURKMAN (1984) observou que espermatozóides de humanos exibem motilidade hiperativada quando incubados dentro de condições capacitantes *in vitro*. CANCEL e colaboradores (2000) determinaram que espermatozóides caracterizados como hiperativados são importantes para estudos com fertilização *in vitro* (FIV) em camundongos. É importante ressaltar que espermatozóides hiperativados antes de alcançar o oviducto são incapazes de fertilizar, porque um espermatozóide hiperativado é incapaz de passar do útero

para o oviducto (SHALGI et al., 1992), porque possui uma trajetória circular ou irregular (SUAREZ, 1996).

O principal método de determinação da hiperativação é a avaliação pelo sistema de análise computadorizado que permite analisar as características seminais mais precisamente, observando a redução da linearidade espermática, o aumento do batimento flagelar assimétrico, o aumento da velocidade média da trajetória etc (SUAREZ, 1996).

A linearidade de 34% tem, geralmente, sido o limite inferior dos espermatozóides humanos não hiperativados *in vivo* (KATZ e YANAGIMACHI, 1980). Já MORTIMER e colaboradores (1998) consideraram que, com linearidade  $\leq 50\%$ , os espermatozóides são considerados hiperativados. 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), típico da hiperativação, descrita no estudo de ROBERTSON e colaboradores. (1988). O grupo de espermatozóides com trajetória transitória para a hiperativação são caracterizados por  $19 < \text{LIN} \leq 34\%$  e BCF igual a  $10,9 \pm 3,9\text{Hz}$  (ROBERTSON et al., 1988). Essa fase transitória entre a ativação e hiperativação tem sido registrada por muitas espécies, incluindo espermatozóide humano (MORTIMER e MORTIMER, 1990). Os espermatozóides não hiperativados são caracterizados por LIN de  $53 \pm 37\%$  e BCF de  $5,3 \pm 5,2 \text{ Hz}$  (ROBERTSON et al., 1988).

## **2.6 Sistema de análise seminal**

A avaliação da qualidade seminal é complementar ao exame clínico para estimar o potencial de um macho como reprodutor. Normalmente, julga-se o volume, aspecto, concentração, motilidade e morfologia espermática (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2005).

### *2.6.1 Análise subjetiva*

Refere-se à classificação do vigor espermático e porcentagem de células espermáticas móveis segundo as características individuais (análise qualitativa) dos espermatozóides do varrão.

A análise do vigor espermático é individual, observando em torno de cinquenta células, aleatoriamente, para a avaliação das características. Após esta análise individual, uma observação coletiva deve ser feita em todas as células do campo do microscópio, a fim de se determinar a proporção de diferentes características de vigor espermático, chegando-se então à nota “quebrada”. Para uma análise confiável, ao menos três campos do microscópio devem ser avaliados. No quadro 1, estão colocados os parâmetros a partir dos quais são dadas as notas de 0 a 5, relacionando-se ao vigor, presença ou ausência de deslocamento e tipo de movimento (TONIOLLI, 1996).

**Quadro 1.** Parâmetros de classificação das características espermáticas – Análise subjetiva

<b>NOTA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
0,0	Todos os espermatozóides estão imóveis.
0,5	Movimentos esporádicos fracos e sem deslocamentos.
1,0	Movimentos circulares contínuos e fracos. Deslocamento muito lento ou sem deslocamento; tremores do espermatozóide e fracas oscilações do flagelo de eficácia nula.
1,5	Movimentos circulares fracos com deslocamento ( $\pm 50\%$ ), espermatozóides não saem do campo do microscópio (C.M.).
2,0	Movimentos circulares fracos e desorganizados com deslocamento sem sair do C.M. Tremores com alguns espermatozóides se deslocando mais rápido com oscilações fracas do flagelo.
2,5	Movimentos circulares/retilíneos, médios com deslocamento, espermatozóides saem do campo do microscópio. As oscilações do flagelo são de intensidade média.
3,0	Movimentos retilíneos, alguns curvilíneos sem tremores e com raio bem maior com oscilações intensas do flagelo; espermatozóides saem do C.M. (50 A 60%).
3,5	Movimentos retilíneos fortes e intensos com deslocamento, espermatozóides saem do C.M. (60 a 70%), com oscilações fortes do flagelo.
4,0	Movimentos retilíneos fortes e intensos com deslocamento, espermatozóides saem do C.M. (80 a 90%), com oscilações fortes do flagelo.
4,5	Movimentos retilíneos e flechantes fortes, espermatozóides saem do campo do microscópio (80 a 90%), com oscilações muito fortes do flagelo.
5,0	Movimentos retilíneos e flechantes muito fortes, espermatozóides saem do campo do microscópio ( $\geq 90\%$ ), com oscilações muito fortes do flagelo.

### 2.6.2 Análise computadorizada

O método clássico de julgamento da qualidade seminal tem sido baseado em uma avaliação subjetiva dos parâmetros (VERSTENGEN et al., 2002). Alguns pesquisadores como BOYER e colaboradores (1989) ressaltaram a importância e necessidade de uma metodologia objetiva, o que motivou a elaboração e o desenvolvimento de instrumentos automatizados capazes de analisar as trajetórias dos espermatozoides.

A análise de sêmen assistida por computador (CASA) pode ser definida como um sistema automatizado para visualizar, digitalizar e analisar imagens sucessivas dos espermatozoides, fornecendo informação acurada, precisa e significativa do movimento individual de cada espermatozoide e também resumos estatísticos das subpopulações espermáticas (AMANN & KATZ, 2004). Espermatozoides de diferentes espécies têm sido analisados pela CASA (DAVIS & KATZ, 1992).

Muitos estudos de sêmen suíno têm usado o sistema CASA para realizar uma análise objetiva da motilidade (ABAIGAR et al., 1999; ERIKSSON et al., 2001; PEÑA et al., 2003).

Nos últimos anos, os sistemas de avaliação automática têm mostrado ser uma ferramenta útil na avaliação das propriedades cinemáticas do espermatozoide individual do ejaculado, mostrando grande potencial para prever a fertilidade do macho, por meio da correlação da velocidade de natação do espermatozoide com a fertilização de oócito *in vitro* e *in vivo* (COX et al., 2006).

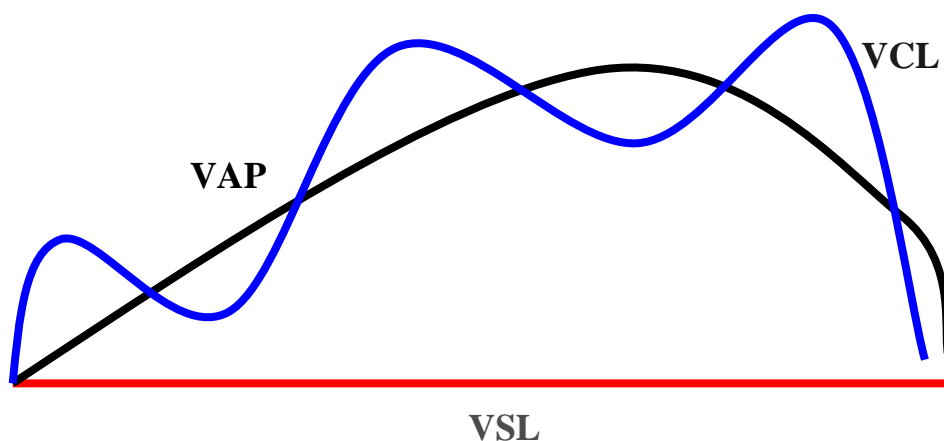
A concentração espermática tem influência nos resultados da CASA. Estudos com humano e animal têm demonstrado que o sistema CASA não é eficaz para avaliações de amostras espermáticas com alta ou baixa concentração, assim, para uma correta análise, a concentração espermática deve estar entre 20 a 50 x10<sup>6</sup> spz/ml (BUDWORTH et al., 1987; DAVIS e KATZ, 1993). TARDIF e colaboradores (1997) utilizaram um sêmen processado para a CASA com uma concentração de aproximadamente 20 x 10<sup>6</sup> spz/mL.

De acordo com BOYER et al. (1989) e VERSTENGEN et al. (2002) os parâmetros comumente obtidos por meio da CASA são: velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), amplitude de deslocamento lateral

da cabeça (ALH), frequência de batimento cruzado (BCF), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), oscilação (WOB) (vide quadro 2; Figura 1).

**Quadro 2.** Parâmetros da motilidade espermática obtidos por meio da CASA

Parâmetro	Sigla	Unidade	Descrição
Velocidade curvilinear	VCL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade da trajetória real do espermatozóide
Velocidade média da trajetória	VAP	$\mu\text{m/s}$	Velocidade da trajetória média do espermatozóide
Velocidade linear	VSL	$\mu\text{m/s}$	Velocidade em função da linha reta estabelecida entre o primeiro e último ponto da trajetória do espermatozóide
Linearidade	LIN	%	Relação percentual entre VSL e VCL
Retilinearidade	STR	%	Relação percentual entre VSL e VAP
Index de oscilação	OSC	%	Relação percentual entre VAP e VCL
Amplitude de deslocamento lateral da cabeça	ALH	$\mu\text{m}$	Deslocamento médio da cabeça do espermatozóide em sua trajetória real
Frequência de batimento cruzado	BCF	Hz	Frequência que a cabeça do espermatozóide atravessa a trajetória média



**Figura 1.** Velocidades obtidas pelo sistema CASA. VAP: velocidade média da trajetória; VCL: velocidade curvilinear; VSL: velocidade linear progressiva.

Fonte: (BOYER et al., 1989; VERSTENGEN et al., 2002).

Na tentativa de correlacionar os parâmetros da CASA com a taxa de fertilização, verificou-se que os valores de VAP, VSL e VCL são significativamente maiores em amostras que produzem mais de 50% de oócito fertilizados do que naquelas em que a taxa de fertilização de oócito é menor que 50% (VERSTEGEN et al., 2002), comprovando que amostras com elevados valores de VAP, VCL, VSL, LIN e BCF apresentam melhor migração e penetração no muco cervical (MORTIMER, 2000; VERSTEGEN et al., 2002). Além disso, parâmetros como BCF e LIN têm revelado correlação positiva com a taxa de prenhez em alguns estudos (VERSTEGEN et al., 2002).

Pode-se dizer que o desenvolvimento inicial dos sistemas CASA foi baseado na hipótese de que a motilidade espermática era o principal critério seminal. Entretanto, com o advento da fertilização *in vitro*, a qualidade do movimento dos espermatozóides tem sido relegada em alguns casos (AMANN e KATZ, 2004). Assim deve-se destacar que os esforços não devem ser apenas direcionados ao desenvolvimento de sistemas CASA superiores, mas também, devem ser relacionados ao aperfeiçoamento dos avaliadores de sêmen.

### 3. JUSTIFICATIVA

O sêmen suíno difere em muitos aspectos do sêmen de outros animais domésticos por ser produzido em grande quantidade, ser extremamente sensível ao choque térmico, ter um curto período de vida dos espermatozóides resfriados, além de reduzida resistência à contaminação bacteriana e toxinas (MIES FILHO, 1987). Na técnica praticada normalmente para conservação do sêmen suíno, normalmente se utilizam diluidores de curta duração (BTS) e uma temperatura variável de 15 a 18° C para evitar problemas de motilidade reduzida, morfologia entre outros (CÔRREA et al., 2001).

Os efeitos do cálcio na motilidade dos espermatozóides de mamíferos vêm sendo investigados, com controvérsias nos resultados em vários laboratórios. Significativas melhorias na motilidade espermática em resposta ao cálcio extracelular têm sido observadas, mas FAKIH e colaboradores (1986) verificaram que o cálcio não entra nos espermatozóides. Outros resultados indicam que o cálcio pode auxiliar na velocidade dos espermatozóides e reduzir o tempo para perda da motilidade (FAKIH et al., 1986).

NISHIMURA (1993) observou que o movimento de espermatozóides é inibido por elevada concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Na presença de altas concentrações de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , um grande influxo desses íons induzido por baixas temperaturas parece diminuir a motilidade. Contudo o mesmo autor também relatou que esses íons têm um papel regulador no controle da motilidade e metabolismo energético. Assim, o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  resultaram na estimulação da função respiratória e motilidade em espermatozóides bovinos (NISHIMURA, 1993).

Assim, torna-se necessário avaliar o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular no vigor e na motilidade espermática *in vitro*, e se a adição de íons cálcio ao diluidor BTS para sêmen suíno pode promover a hiperativação dos espermatozóides do varrão, visto que essa é uma característica espermática importante para um possível fertilização *in vitro* (FIV).

#### **4. HIPÓTESE CIENTÍFICA**

O uso de íons cálcio na conservação de sêmen suíno promove a hiperativação da célula espermática.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações dos íons  $\text{Ca}^{2+}$  em diluidores de sêmen sobre os espermatozóides suínos *in vitro*.

### **5.2 Objetivos específicos**

\* Testar qual das concentrações de íons  $\text{Ca}^{2+}$  proporciona alterações do vigor e motilidade espermática.

\* Avaliar o efeito das concentrações de íons Cálcio na motilidade espermática: hiperativação.

\* Desenvolver uma nova composição de diluidor para incrementar o vigor e a motilidade, mantendo a morfologia espermática compatível com os padrões de normalidade.

## **6. CAPÍTULO 1**

### **Artigo 1**

#### **Efeito das concentrações de íons cálcio no sêmen suíno resfriado**

Iara Gonçalves Roberto, Lúcia Daniel Machado da Silva, Airton Alencar de Araújo,  
Darlete Lima Matos, Ricardo Tonioli

Artigo submetido em 11 de junho de 2008 ao periódico “Ciência Animal Brasileira”,  
classificada como QUALIS A nacional.

## **Efeito das concentrações de íons cálcio no sêmen suíno resfriado**

Effect of concentrations of calcium ions in boar sperm cold

### **RESUMO**

Estudos mostram que o íon cálcio é muito importante para regulação da motilidade espermática. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações dos íons cálcio no diluidor BTS para sêmen suíno sobre a qualidade dos espermatozoides suínos mantidos resfriados. O sêmen foi coletado de varrões e seus parâmetros foram analisados. O experimento contou com a utilização de diferentes tipos de cálcio diluídos em BTS: Carbonato de cálcio, Hidróxido de cálcio, Fostato dibásico anidro de cálcio, Sulfato hidratado de cálcio e Sulfato anidro de cálcio, distribuídos em diferentes concentrações: 0 mM – controle; 0,4mM; 4mM; 40Mm e 400mM. As amostras foram armazenadas a 17°C, elevando-se a temperatura a 37°C para a avaliação subjetiva do vigor e motilidade espermática, realizada do D0 até D2. O teste de viabilidade espermática foi realizado no D0 e D2. Assim, concluiu-se que a adição dos sais de cálcio gerou, a partir do primeiro dia, alterações no vigor e na motilidade dos espermatozoides suínos, e que não exerceram efeito negativo sobre a membrana espermática nem sobre a membrana acrossômica, ressaltando-se que os valores de vigor dessas amostras caracterizam movimentos circulares e desorganizados, o que pode estar relacionado à hiperativação.

**Palavras chave:** Espermatozóide, cálcio, motilidade.

### **ABSTRACT**

Studies show that the calcium ion is very important for regulation of sperm motility. The objective of this study was to evaluate the effect of different types and concentrations of calcium ions in BTS extender for boar semen on the quality of spermatozoa boars kept cold. The semen was collected from boars and its parameters were analyzed. The experiment involved the use of different types of calcium in BTS extender: calcium carbonate, calcium hydroxide, anhydrous dibasic calcium fostate, hydrated calcium sulfate and calcium sulfate anhydrous, distributed in different concentrations: 0 mM - control, 0.4 mM; 4 mM; 40Mm and 400mM. The samples were stored at 17°C, increasing the temperature at 37°C for the subjective evaluation of the force and sperm motility, which are made of D0 to D2. The test was conducted in sperm viability D0 and D2. Thus, it was concluded that the addition of calcium salts generated from the first day, and force changes in sperm motility of boars, and

have not had negative effect on the sperm membrane. It points out that the values of force characterize the samples circular movements and disorganized, which may be related to hyperactivation.

**Keywords:** Spermatozoa, calcium, motility

## INTRODUÇÃO

O cálcio é um metal iônico abundante e um dos mais importantes elementos constitucionais do organismo e da fisiologia celular. Cerca de 90% do cálcio corporal é encontrado nos dentes e ossos. A fração restante encontra-se envolvida em processos fisiológicos de excitação, crescimento, locomoção celular, estabilidade da membrana plasmática, comunicação intercelular, fusão de membranas, processos de transportes intracelulares e fertilização. O íon cálcio pode atuar, tanto no meio intracelular, como extracelular, dependendo do seu sítio de ação (GILMAN et al., 1991).

Alguns estudos mostram que a inclusão de íons  $\text{Ca}^{2+}$  nos diluidores de sêmen tem um papel especial na regulação da motilidade espermática de vertebrados e invertebrados. Alguns resultados sugerem que o cálcio extracelular é indispensável à ativação da motilidade espermática, além de ser um pré-requisito para o quimiotactismo celular (YOSHIDA et al., 1994).

Em mamíferos, os íons  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular regulam a fertilização por meio da participação em muitos eventos, incluindo hiperativação da motilidade espermática, reação acrossômica, fusão espermatozóide-oócito e ativação do oócito (SUAREZ et al., 1993). Também se afirma de acordo com MARQUEZ et al. (2007), que a elevação desse íon está associada ao processo de capacitação.

As reservas de cálcio intracelular encontram-se em organelas membranosas, como retículo endoplasmático e sarcoplasmático. No espermatozóide, duas organelas membranosas são encontradas na região do colo: envelope nuclear redundante (ENR) e mitocôndria (HO et al., 2002). A sua liberação depende de sinais elétricos, químicos ou anatômicos sobre as bombas de cálcio, canais de cálcio e atividade de trocas iônicas (BOOTMAN et al., 2001).

A entrada de cálcio na célula ocorre através de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  presentes na membrana plasmática: canais potencial – dependente (CATTERAL, 1995) e receptor – operado (PITCHER et al., 1998), trocas de sódio – cálcio (VINES et al., 2002) e canais nucleotídeo cíclico (WIESNER et al., 2007). Na célula espermática, além desses canais que estão localizados no flagelo, existem proteínas específicas que funcionam como canais iônicos: família CatSper, localizadas na peça principal do flagelo (CARLSON et al., 2003).

No reprodutor suíno, as modificações da permeabilidade de membrana espermática aos íons e, em particular, ao cálcio durante a capacitação, seriam responsáveis pela mudança da motilidade dos espermatozoides (DARSZON et al., 1999). Para espermatozoides, o aumento dos níveis milimolar de cálcio extracelular são requeridos para desencadear dois processos que precedem a fertilização: a motilidade hiperativada e a reação acrossômica. A hiperativação ocorre algum tempo depois da inseminação dentro do trato reprodutivo da fêmea e tem sido associada com o alcance da capacidade para fertilização *in vitro* (SUAREZ et al., 1993). *In vitro*, espermatozoides de camundogo hiperativados penetram na zona pelúcida mais efetivamente do que os espermatozoides não hiperativados (STAUSS et al., 1995).

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 oviducto, dependendo da espécie. Essa motilidade é caracterizada pela alta amplitude de inclinação flagelar, batimentos flagelares assimétricos e trajetória circular ou irregular (YANAGIMACHI, 1994). O  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular é requerido para a manutenção da hiperativação em espermatozoides de camundongos (YANAGIMACHI, 1982) e a concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular dentro do flagelo de espermatozoide hiperativado é elevada (SUAREZ et al., 1993). Assim pode-se observar que o íon  $\text{Ca}^{2+}$  tem mostrado-se como crucial para iniciação e manutenção da motilidade hiperativada (HO & SUAREZ, 2001).

A melhoria na velocidade espermática causada pelo cálcio é instantânea. Então, a adição de cálcio ao diluidor 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. O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito de diferentes

tipos e concentrações dos íons cálcio no diluidor BTS para sêmen suíno sobre a qualidade dos espermatozóides suínos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Local e animais experimentais**

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen da FAVET-UECE, utilizando-se dois varrões das raças Durok e Dalland, mantidos sob o mesmo regime de estabulação e manejo alimentar (dois quilos de ração/dia). As análises microscópicas foram realizadas no Laboratório de Reprodução de Carnívoros da FAVET-UECE.

### **Coleta e avaliação do sêmen**

O sêmen dos reprodutores suínos foi coletado uma vez por semana, durante cinco semanas consecutivas, 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 separação da parte gelatinosa. O ejaculado, após a coleta, foi levado ao laboratório para avaliação da concentração, volume, total de espermatozóides, temperatura, vigor e motilidade espermática, utilizando-se microscópio óptico com aumento de 200x. Somente ejaculados com valores  $\geq 80\%$  de motilidade foram processados.

### **Delineamento experimental**

No experimento, foram testadas individualmente cinco formas de cálcio adicionadas ao diluidor BTS – *Betsville Thawing Solution* (BTS puro – controle) em quatro concentrações diferentes. (Quadro 1).

Cada jaculado foi dividido em 21 tratamentos diluídos para uma concentração final de  $35 \times 10^6$  spz/ml em por tratamento. As amostras de cada tratamento foram colocadas em tubos de ensaio de 3 ml, que correspondem individualmente a cada um dos dias de análise (D0, dia da coleta; D1 e D2), e conservadas a uma temperatura entre 15 e 17°C. Em cada dia de análise, foram retirados os tubos equivalentes a cada macho e cada diluidor para serem incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Após o período de incubação, foi realizada a avaliação seminal subjetiva das características de vigor espermático (notas de 0 a 5) e

motilidade espermática (valores de 0 a 100%) de acordo com a metodologia proposta por TONIOLLI (1996).

**Quadro 1.** Constituição dos tratamentos de cálcio em função da concentração e do período de conservação.

<b>Tratamentos</b>	<b>Concentrações de Cálcio (mM)</b>	<b>Período de conservação</b>
BTS	0 (controle)	D0; D1; D2
Carbonato de cálcio - $\text{CaCO}_3$	0,4; 4; 40; 400	D0; D1; D2
Fosfato dibásico anidro de cálcio - $\text{CaHPO}_4$	0,4; 4; 40; 400	D0; D1; D2
Hidróxido de cálcio - $\text{Ca(OH)}_2$	0,4; 4; 40; 400	D0; D1; D2
Sulfato diidratado de cálcio - $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,4; 4; 40; 400	D0; D1; D2
Sulfato anidro de cálcio - $\text{CaSO}_4$	0,4; 4; 40; 400	D0; D1; D2

#### **Avaliação dos espermatozóides vivos/mortos**

De cada tratamento, foram realizados três esfregaços de sêmen, a fim de se proceder à análise da porcentagem de vivos/mortos. As amostras de sêmen para os esfregaços foram feitas sempre aos 10 minutos de incubação, realizadas nos seguintes dias de conservação: os esfregaços foram feitos no D0 (dia da coleta) dividido em: D0.0 (poucos instantes após a adição de sêmen aos diluidores de  $\text{Ca}^{2+}$ ) e D0.1 (no momento da avaliação espermática) e D2 (último dia de conservação).

As avaliações foram feitas por meio da microscopia óptica a um aumento de 400x. A solução corante foi formada por 0,1 g de azul de bromofenol ; 0,4 g de citrato de sódio e 10 mL de água destilada. A osmolaridade da solução foi medida e, quando necessário, ajustada com água destilada até ficar entre 300 e 310 mOsm. A solução foi guardada em geladeira a 17°C. Para se preparar o esfregaço, juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante, à mesma temperatura, e homogenizou-se. Após 30 segundos, retirou-se uma gota dessa mistura, e realizou-se o esfregaço que permaneceu em temperatura ambiente antes da análise. Segundo a vitalidade, os espermatozóides foram classificados em 2 categorias diferentes:

- 1) Espermatozóides vivos com acrossoma intacto, não corados;
- 2) Espermatozóides mortos, corados.

### **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 para comparações entre os dias de análises dos tratamentos e para comparação entre os tratamentos. Utilizou-se o programa de estatística Systat 7.0. Considerou-se diferença estatística quando  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Coleta e avaliação do sêmen a fresco**

Para o experimento, foram utilizados um total de dez ejaculados, tendo-se como médias para os parâmetros avaliados: Temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ):  $36,1 \pm 0,1$ ; concentração ( $\times 10^6$  spz/ml):  $297 \pm 23$ ; volume (ml):  $255,5 \pm 23,0$ ; total de espermatozoides ( $\times 10^9$  spz):  $75,1 \pm 8,8$ ; vigor espermático:  $4,1 \pm 0,1$  e motilidade espermática (%):  $91 \pm 1$ .

### **Motilidade e vigor espermáticos**

Os valores médios de vigor e motilidade das amostras, que receberam diferentes concentrações de carbonato de cálcio -  $\text{CaCO}_3$  e hidróxido de cálcio -  $\text{Ca(OH)}_2$ , estão representados na Tabela 1. As amostras que receberam as maiores concentrações de  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{Ca(OH)}_2$  (40 e 400mM) tiveram valores de motilidade e vigor significativamente menores ( $P < 0,05$ ) que as demais concentrações nas análises dos dias: D0 (dia da coleta), D1 e D2, verificando-se que altas concentrações desses sais no meio extracelular têm efeito negativo sobre o vigor e a motilidade espermática. As amostras que receberam 0,4 e 4mM de  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{Ca(OH)}_2$  não diferiram, significativamente, do controle (0mM de  $\text{CaCO}_3$  e de  $\text{Ca(OH)}_2$ ) no D0, mas no D1 e D2 seus valores foram significativamente menores para vigor e motilidade, ressaltando-se que os valores de vigor dessas amostras caracterizam movimentos circulares e desorganizados (TONIOLLI, 1996), o que pode estar relacionado à hiperativação.

Observa-se, também, que em cada concentração de cálcio ( $\text{CaCO}_3$  e  $\text{Ca(OH)}_2$ ) há uma redução progressiva tanto para a motilidade quanto para o vigor espermático ao longo dos tempos de análise (D0, D1 e D2).

**Tabela 1.** Valores médios  $\pm$  SEM para motilidade (%) e vigor espermático (1 a 5) das amostras com diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.

TRAT	CONC de Ca <sup>2+</sup> (mM)	VIGOR - 1 a 5 (DIA)			MOTILIDADE % (DIA)		
		D0	D1	D2	D0	D1	D2
BTS*	0	3,1 $\pm$ 0,3 a A	2,5 $\pm$ 0,1a,b A	2,1 $\pm$ 0,2 b A	60,5 $\pm$ 4,0 a A	50,0 $\pm$ 1,2a,b A	45,0 $\pm$ 6,3 b A
	0,4	2,0 $\pm$ 0,2 a A	1,5 $\pm$ 0,2 b B	1,1 $\pm$ 0,2 b B	49,5 $\pm$ 2,5 a A	40,5 $\pm$ 5,0 b B	33,5 $\pm$ 4,0 b A,B
	4	2,4 $\pm$ 0,3 a A	1,5 $\pm$ 0,2 b B	0,9 $\pm$ 0,1b B	58,5 $\pm$ 5,1 a A	40,5 $\pm$ 4,4 b B	27,5 $\pm$ 4,6 b B
	40	1,3 $\pm$ 0,1 a C	0,2 $\pm$ 0,1 b C	0,5 $\pm$ 0,1 b C	31,5 $\pm$ 4,4 a B	8,0 $\pm$ 3,2 b C	2,0 $\pm$ 2,0 b C
	400	0,8 $\pm$ 0,2 a C	0,1 $\pm$ 0,1 b C	0,0 $\pm$ 0,0 b C	22,5 $\pm$ 5,0 a B	4,0 $\pm$ 2,7 b C	0,0 $\pm$ 0,0 b C
Ca(OH) <sub>2</sub>	0,4	2,3 $\pm$ 0,3 a A	1,7 $\pm$ 0,2 b B	0,9 $\pm$ 0,2 b B	54,5 $\pm$ 4,1 a A	40,5 $\pm$ 4,4 b B	30,0 $\pm$ 4,5 b B
	4	2,5 $\pm$ 0,2 a A	1,7 $\pm$ 0,2 b B	1,4 $\pm$ 0,2 b B	52,0 $\pm$ 4,6 a A	41,0 $\pm$ 4,0 b B	31,0 $\pm$ 4,0 b B
	40	0,1 $\pm$ 0,1 a C	0,0 $\pm$ 0,0 a C	0,0 $\pm$ 0,0 a C	1,0 $\pm$ 1,0 a C	0,0 $\pm$ 0,0 a C	0,0 $\pm$ 0,0 a C
	400	0,1 $\pm$ 0,1 a C	0,0 $\pm$ 0,0 a C	0,0 $\pm$ 0,0 a C	1,0 $\pm$ 1,0 a C	0,0 $\pm$ 0,0 a C	0,0 $\pm$ 0,0 a C
	0,4	2,4 $\pm$ 0,2 a A	1,7 $\pm$ 0,3a,b B	1,0 $\pm$ 0,2 b B	58,0 $\pm$ 4,4 a A	41,5 $\pm$ 3,6a,b B	29,0 $\pm$ 2,6 b B
CaHPO <sub>4</sub>	4	2,2 $\pm$ 0,3 a A	1,5 $\pm$ 0,3 a B	0,7 $\pm$ 0,4 b B	58,5 $\pm$ 5,3 a A	39,5 $\pm$ 5,1 a B	22,5 $\pm$ 3,6 b B
	40	2,3 $\pm$ 0,3 a A	1,9 $\pm$ 0,1 a B	1,4 $\pm$ 0,2 b B	56,0 $\pm$ 5,5 a A	40,0 $\pm$ 5,0 a B	30,5 $\pm$ 2,7 b B
	400	2,1 $\pm$ 0,2 a A	1,6 $\pm$ 0,2a,b B	1,0 $\pm$ 0,2b B	52,5 $\pm$ 3,8 a A	42,0 $\pm$ 3,2a,b B	28,0 $\pm$ 5,3 b B
	0,4	2,4 $\pm$ 0,2 a A	1,5 $\pm$ 0,3 b B	1,5 $\pm$ 0,1 b B	56,5 $\pm$ 4,5 a A	37,5 $\pm$ 5,5 b B	35,0 $\pm$ 4,5 b B
	4	2,6 $\pm$ 0,2 a A	1,8 $\pm$ 0,2a,b B	1,4 $\pm$ 0,3 b B	61,5 $\pm$ 4,5 a A	41,5 $\pm$ 4,8a,b B	36,5 $\pm$ 5,7 b B
CaSO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	40	2,1 $\pm$ 0,3 a A	1,6 $\pm$ 0,2 a B	1,0 $\pm$ 0,2 b B	52,5 $\pm$ 7,0 a A	41,0 $\pm$ 3,6 a B	32,5 $\pm$ 5,4 b B
	400	2,3 $\pm$ 0,3 a A	1,7 $\pm$ 0,2a,b B	1,2 $\pm$ 0,2 b B	54,5 $\pm$ 4,8 a A	41,5 $\pm$ 4,5a,b B	32,5 $\pm$ 5,6 b B
	0,4	2,2 $\pm$ 0,3 a A	1,8 $\pm$ 0,2a,b B	1,0 $\pm$ 0,3 b B	54,0 $\pm$ 5,3 a A	43,5 $\pm$ 3,0a,b B	29,0 $\pm$ 4,6 b B
	4	2,3 $\pm$ 0,2 a A	1,7 $\pm$ 0,2a,b B	1,3 $\pm$ 0,3b B	56,5 $\pm$ 3,8 a A	42,0 $\pm$ 2,2a,b B	33,5 $\pm$ 1,2 b B
	40	2,5 $\pm$ 0,2 a A	1,8 $\pm$ 0,2a,b B	1,2 $\pm$ 0,2 b B	59,0 $\pm$ 4,1 a A	41,5 $\pm$ 3,8a,b B	33,5 $\pm$ 1,0 b B
400	2,8 $\pm$ 0,2 a A	1,6 $\pm$ 0,2 b B	0,8 $\pm$ 0,2 c B	63,0 $\pm$ 3,6 a A	42,0 $\pm$ 3,6 b B	25,0 $\pm$ 5,3 c B	

\* Grupo controle

a,b,c,d comparação na mesma linha em cada parâmetro avaliado

ABCD comparação entre os tratamentos de um mesmo sal na mesma coluna e o controle para os parâmetros avaliados.

(P < 0.05)

TONIOLLI & COMBAMOUS (1999) utilizaram concentrações diferentes de CaCl<sub>2</sub> (0,041; 0,41; 4,1 e 41mM) e observaram que concentrações de 4,1 e 41 mM desse sal promovem um maior aumento da motilidade quando comparado ao das concentrações de 0,041e 0,41 até o terceiro dia de acondicionamento a 17°C. A partir do quarto dia, as diferenças foram maiores com efeito significativamente favorável à concentração de 4,1 mM

de  $\text{CaCl}_2$ , concluindo-se que altas concentrações desse sal no meio extracelular têm 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 espermatozóides. Nos estudos de LIMA (2006), observou-se que as concentrações de 5,0 e 7,5 mM de  $\text{CaCl}_2$  influenciam a motilidade espermática, mantendo maiores frequências de motilidade na escala de 60 – 90%.

Os resultados de motilidade e vigor espermático obtidos pela adição de diferentes concentrações de fosfato dibásico anidro de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), sulfato diidratado de cálcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato anidro de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ) estão apresentados na Tabela 1. As amostras que receberam 0,4; 4; 40 e 400mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  tiveram valores de motilidade e vigor significativamente menores ( $P < 0,05$ ) que o controle no D1 e D2 de análise. Nas análises do D0, não houve diferenças significativas de vigor e motilidade entre as diferentes concentrações de fosfato dibásico anidro de cálcio, sulfato diidratado de cálcio e sulfato anidro de cálcio. Também se deve levar em consideração que os valores médios de vigor dessas amostras com diferentes concentrações de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  caracterizam movimentos circulares/retilíneos com oscilações do flagelo mais vigorosas (TONIOLLI, 1996) do que as encontradas nas amostras de  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , o que pode estar relacionado à hiperativação. Dessa maneira sugere-se uma avaliação das características espermáticas por meio de um sistema de análise computadorizado para determinação da hiperativação. Em cada concentração de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$ ), há uma redução progressiva tanto para a motilidade, quanto para o vigor espermático ao longo dos tempos de análise (D0, D1 e D2).

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 mostrado que a concentração de cálcio livre no meio intracelular é maior no espermatozóide hiperativado do que no ativado. Em espermatozóides de touro, a motilidade hiperativada pode ser facilmente distinguida da motilidade ativada. A motilidade ativada é caracterizada pelo batimento simétrico do flagelo que resulta em uma trajetória linear; e a motilidade hiperativada, pelo batimento flagelar assimétrico, que produz padrões de movimentos circulares ou em figura de oito (MARQUEZ e SUAREZ, 2004).

Alguns estudos já foram realizados utilizando o cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) adicionado ao diluidor de sêmen em concentrações variadas, por exemplo, 1 mM em espermatozoides de camundongos (NAKAMURA et al., 1993); 2,5; 5,0 e 7,5mM em espermatozoides de suínos (LIMA, 2006); 11mM em espermatozoides de ascídia (YOSHIDA et al., 2003); 0,22; 0,5; 1,5 e 2,5mM em espermatozoides de humano (MARÍN-BRIGGILER et al., 2003). Esse sal, muitas vezes, foi escolhido por apresentar boa estabilidade e não precipitar no meio de diluição (LIMA, 2006). Pesquisas utilizando o hidróxido de cálcio [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ], 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 ao aumento da concentração intracelular desse íon (KIRICHOK et al., 2006).

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).

Assim, de acordo com DARSZON et al. (1999), o íon cálcio tem um papel regulador no controle da motilidade e do metabolismo energético do espermatozoide. 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* (GADEA, 2005). Segundo BORTOLOZZO et al. (2005), a avaliação da motilidade seminal por períodos prolongados é importante, uma vez que as diluições são extremamente altas e a presença de plasma seminal é praticamente nula.

### **Avaliação dos espermatozoides vivos/mortos**

Os valores médios de espermatozoides vivos das amostras, que receberam diferentes concentrações de carbonato de cálcio e hidróxido de cálcio: D0.0 (momento da diluição), D0.1 (quatro horas após o acondicionamento a 17°C) e D2, estão representados na Tabela 2. As amostras, que receberam as maiores concentrações de  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (40 e 400mM), tiveram valores de espermatozoides vivos significativamente menores ( $P < 0,05$ ) que as demais concentrações nas análises do D0.0 e D0.1. Nas análises do D2, não houve diferenças significativas para esses valores entre as diferentes concentrações de cálcio. As amostras, que receberam 0,4 e 4mM de  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , não diferiram significativamente do controle (BTS) em nenhum dos dias de análise. Observa-se, também, que, no controle BTS e nas concentrações de 0,4; 4; 40 e 400mM de cálcio ( $\text{CaCO}_3$  e  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) no D0.0 e D0.1, não

houve diferenças significativas para os valores de espermatozóides vivos, e esses valores são significativamente maiores do que os observados no D2.

**Tabela 2.** Valores percentuais médios  $\pm$  SEM para espermatozóides vivos das amostras nas diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.

TRAT	CONC de Ca <sup>2+</sup> (mM)	VIVOS (DIA)		
		D0.0	D0.1	D2
BTS*	0	56,5 $\pm$ 5 a A	60,5 $\pm$ 5 a A	34 $\pm$ 4 b A
	0,4	62,0 $\pm$ 3 a A	60,5 $\pm$ 3 a A	32,5 $\pm$ 5 b A
	4	60,5 $\pm$ 4,5 a A	60,5 $\pm$ 4 a A	33,5 $\pm$ 4,5 b A
	40	42,5 $\pm$ 4 a B	42,0 $\pm$ 3 a B	22,5 $\pm$ 4,5 b A
	400	42,5 $\pm$ 4 a B	43,0 $\pm$ 3 a B	24,0 $\pm$ 4,5 b A
Ca(OH) <sub>2</sub>	0,4	56,5 $\pm$ 5 a A	64,5 $\pm$ 4,5a A	33,0 $\pm$ 3,5 b A
	4	58,0 $\pm$ 5 a A	60,0 $\pm$ 3,5a A	37,0 $\pm$ 4 b A
	40	34,0 $\pm$ 6 a B	30,5 $\pm$ 7 a B	25,0 $\pm$ 3 b A
	400	35,0 $\pm$ 6 a B	32,5 $\pm$ 7 a B	25,0 $\pm$ 4 b A
	CaHPO <sub>4</sub>	0,4	58,5 $\pm$ 4,5 a A	64,0 $\pm$ 3 a A
4		56,5 $\pm$ 5 a A	60 $\pm$ 5 a A	38 $\pm$ 3 b A
40		56,0 $\pm$ 6 a A	60,0 $\pm$ 6 a A	35,5 $\pm$ 3 b A
400		53,5 $\pm$ 5 a A	60,0 $\pm$ 4 a A	31,0 $\pm$ 3 b A
CaSO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O		0,4	54,0 $\pm$ 5 a A	58,5 $\pm$ 5 a A
	4	58,5 $\pm$ 5 a A	63,0 $\pm$ 4,5a A	43,5 $\pm$ 4,5 b A
	40	58,5 $\pm$ 6 a A	59,0 $\pm$ 6 a A	34 $\pm$ 3,5 b A
	400	58,5 $\pm$ 7 a A	61,5 $\pm$ 5 a A	31,0 $\pm$ 3,5 b A
	CaSO <sub>4</sub>	0,4	59,0 $\pm$ 6 a A	63,0 $\pm$ 6 a A
4		61,0 $\pm$ 4 a A	64 $\pm$ 3 a A	28,5 $\pm$ 3 b A
40		63,5 $\pm$ 3 a A	63,0 $\pm$ 3 a A	28,5 $\pm$ 3 b A
400		64,5 $\pm$ 3 a A	62,5 $\pm$ 3 a A	32,0 $\pm$ 3 b A

\* Grupo controle

a,b,c,d comparação na mesma linha em cada parâmetro avaliado

ABCD comparação entre os tratamentos de um mesmo sal na mesma coluna e o controle na mesma coluna para os parâmetros avaliados.

(P < 0.05)

Os valores médios de espermatozóides vivos das amostras, que receberem diferentes concentrações de fosfato dibásico anidro de cálcio, sulfato diidratado de cálcio e sulfato anidro de cálcio: D0.0 (momento da diluição), D0.1 (quatro horas após o acondicionamento a 17°C) e D2, estão representados na Tabela 2. Nas análises do D0.0, D0.1 e D2, não houve

diferenças significativas entre os valores encontrados nas diferentes concentrações de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  e no controle. Embora esses sais tenham exercido efeito sobre o vigor e motilidade espermática no segundo dia de análise, não foram capazes de alterar a viabilidade espermática. Também pôde ser verificado que, em cada concentração de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$ ) no D0.0 e D0.1, não houve diferenças significativas para os valores de espermatozóides vivos e esses valores são significativamente maiores do que os observados no D2.

Após a ejaculação, os espermatozóides passam por um processo de capacitação, e a reação acrossômica é acompanhada pelo aumento da concentração intracelular de cálcio. 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 espermatozóides (DARSZON et al., 1999).

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

Pode-se afirmar que os sais carbonato de cálcio e hidróxido de cálcio nos níveis de 0,4 e 4mM e os sais fosfato dibásico anidro de cálcio, sulfato diidratado de cálcio e sulfato anidro de cálcio nos níveis 0,4; 4; 40 e 400mM não exerceram efeito negativo sobre a membrana espermática nem sobre a membrana acrossômica. Resultados diferentes foram observados nos sais carbonato de cálcio e hidróxido de cálcio nos níveis 40 e 400mM que apresentaram valores significativamente menores de espermatozóides vivos, o que permite afirmar que o cálcio restante no meio extracelular provocou um desequilíbrio nocivo à membrana dos espermatozóides.

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que a adição dos sais de cálcio gerou, a partir do primeiro dia, alterações no vigor e na motilidade dos espermatozóides suínos, ressaltando-se que os valores de vigor dessas amostras caracterizam movimentos circulares e desorganizados, o que pode estar

relacionado à hiperativação. Também se observou que esses sais em seus níveis já mencionados não exerceram efeito negativo sobre a membrana espermática.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FUNCAP pelo apoio financeiro; ao Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo pela colaboração nas análises estatísticas e ao Laboratório de Reprodução de Carnívoros.

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

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.

CARLSON, A.E.; WESTENBROEK, R.E.; QILL, T.; REN, D.; CLAPHAM, D.E.; HILLE, B.; GARBERS, D.; BABCOCK, D.F. CatSper 1 required for evoked  $Ca^{2+}$  entry and control of flagellar function in sperm. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 100, p. 14864 – 14868, 2003.

CATTERALL, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 493 – 531, 1995.

DARSZON, A.; LABARCA, P.; NISHIGAKI, T.; & ESPINOSA, F. Ion channels in sperm physiology. **Physiological reviews**, v. 79, p. 481 – 510, 1999.

FRASER, L.R. Minimum and maximum extracellular  $Ca^{2+}$  requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, p. 77 – 89, 1987.

GADEA, J. Sperma 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**. 8. ed. Rio de Janeiro: Granabara Koogan, p.1232, 1991.

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.

HO, H-C.; GRANISH, K.A.; SUAREZ, S.S. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by  $Ca^{2+}$  and not cAMP. **Developmental Biology**, v. 250, p. 208 – 217, 2002.

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. 737 – 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.

NAKAMURA, M.; MORIYA, M.; BABA, T.; MICHIKAWA, Y.; YAMANUBE, T.; ARAI, K.; OKINAGA, S.; KOBAYASHI, T. An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into acrosomo of rat sperm. **Experimental Cell Research**, v. 205, p. 101 – 110, 1993.

PITCHER, J.A.; FREEDMAN, N.J.; LEFKOWITZ, R.J. G protein-coupled receptor kinases. **Annual Reviews Biochem.**, v. 67, p. 653 – 692, 1998.

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 cicle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, p. 4660 – 4664, 1993.

SUAREZ, S.S Hyperativated motility sperm. *Journal of Andrology*, v. 14, p. 331 – 335, 1996.

TONIOLLI, R. **Estudo do poder fecundante dos espermatozóides do varrão: melhorias nas condições de conservação.** 1996. Tese (Doutorado) - Université François Rabelais de Tours, França, 1996.

TONIOLLI, R.; COMBARNOUS, Y. Adição de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) ao diluidor do sêmen reprodutos: efeito sobra a motilidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.1, p. 33 -40, 1999.

VINES, C.A; YOSHIDA, K.; GRIFFIN, F.J.; PILLAI, M.C.; MORISAWA, M.; YANAGIMACHI, R.; CHERR, G.N. Motility initiation in herring sperm is regulated by reverse sodium-calcium exchange. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 2036 – 2031, 2002.

WIESNER, B.; WEINER, J.; MIDDENDORFF, R.; HAGEN, V.; KAUPP, U.B.; WEYAND, I. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca<sup>2+</sup> entry into sperm. **The Journal of Cell Biology**, v. 142, p. 473 – 484, 2007.

YANAGIMACHI, R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. **Gamete Res.**, 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  $\text{Ca}^{2+}$  alone contributes sperm chemotaxis in the ascidian *Ciona savugnyi*. **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.

## **7. CAPÍTULO 2**

### **Artigo 2**

#### **Avaliação computadorizada do efeito das concentrações de íons cálcio no sêmen suíno resfriado: Hiperativação**

Iara Gonçalves Roberto, Lúcia Daniel Machado da Silva, Airton Alencar de Araújo,  
Darlete Lima Matos, Ricardo Tonioli

## **Avaliação computadorizada do efeito das concentrações de íons cálcio no sêmen suíno resfriado: Hiperativação**

Evaluation computed the effect of concentrations of calcium ions in boar sperm cold:  
Hiperativação

### **RESUMO**

Estudos mostram que o íon cálcio é um tipo de mensageiro intracelular que regula fenômenos celulares fisiológicos, como a motilidade. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se diferentes tipos e concentrações de íons cálcio no diluidor BTS para sêmen suíno podem promover a hiperativação espermática. O sêmen foi coletado de varrões e seus parâmetros foram analisados. O experimento contou com a utilização de diferentes tipos de cálcio diluídos em BTS: Carbonato de cálcio, Hidróxido de cálcio, Fostato dibásico anidro de cálcio, Sulfato hidratado de cálcio e Sulfato anidro de cálcio, distribuídos em diferentes concentrações: 0 mM – controle; 0,4mM e 4mM. As amostras foram armazenadas a 17°C, elevando-se a temperatura a 37°C para a avaliação objetiva computadorizada, realizada do D0 até D2. Os resultados para a concentração de 4 mM ( $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$ ) 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 ( $\leq 35\%$ ). Os testes de viabilidade e morfologia espermática foram realizados no D0 e D2. Assim, concluiu-se que a adição de 4 mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  gerou a hiperativação das células espermáticas e que não exerceu efeito negativo sobre a membrana espermática.

**Palavras chave:** Espermatozóide; cálcio; motilidade, hiperativação.

### **ABSTRACT**

Studies show that the calcium ion is a type of intracellular messenger that regulates cellular physiological phenomena, such as motility. The objective of this study was to assess whether different types and concentrations of calcium ions in dilutive BTS for boar semen can promote hyperactivation sperm. The semen was collected from boars and its parameters were analyzed. The experiment involved the use of different types of calcium diluted in BTS: calcium carbonate, calcium hydroxide, anhydrous dibasic calcium fostate, hydrated calcium sulfate and calcium sulfate anhydrous, distributed in different concentrations: 0 mM - control, 0, 4 mM and 4 mM. The samples were stored at 17°C, increasing the temperature at 37°C for

objective assessment computed held the D0 to D2. The results for the concentration of 4 mM (CaHPO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O and CaSO<sub>4</sub>) indicated an increase in average speed of trajectory ( $\geq 40 \mu\text{m/s}$ ) and the frequency of cross beat ( $\geq 8.0 \text{ Hz}$ ), besides reducing the linearity ( $\leq 35\%$ ). Tests for sperm viability and morphology were made in the D0 and D2. Thus, it was concluded that the addition of 4 mM CaHPO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O and CaSO<sub>4</sub> generated the hyperactivation of sperm cells and have not had negative effect on the sperm membrane.

**Keywords:** Spermatozoa; calcium; motility; hyperactivation

## INTRODUÇÃO

O íon cálcio é um tipo de segundo mensageiro intracelular que regula fenômenos celulares fisiológicos (BOOTMAN et al., 2001). Esse íon pode ser usado como um sinal, porque sua concentração no citosol é mantida em níveis muito baixos ( $10^{-4}$  mM), enquanto é alta no líquido extracelular (1-2 mM) e no lúmen do retículo endoplasmático. Assim, existe um grande gradiente através da membrana plasmática tendendo conduzir o íon para o citosol. Quando o sinal abre temporariamente os canais de Ca<sup>2+</sup> na membrana, o íon migra para o citosol, aumentando de 10 a 20 vezes sua concentração local e estimulando as proteínas celulares que correspondem ao mesmo (ALBERTS et al., 2004). O Ca<sup>2+</sup> intracelular não muda na ausência de Ca<sup>2+</sup> externo, mas uma subsequente adição de Ca<sup>2+</sup> ao meio causa um aumento do Ca<sup>2+</sup> intracelular e da motilidade espermática (KRASZNAI et al., 2000).

Os tipos principais de canais de Ca<sup>2+</sup> presentes nas células são: 1) Os canais de Ca<sup>2+</sup> dependentes de voltagem se abrem, na membrana plasmática, em resposta à despolarização e permitem a entrada do íon (ALBERTS et al., 2004): canais potencial – dependente (CATTERAL, 1995) e receptor – operado (PITCHER et al., 1998), trocas de sódio – cálcio (VINES et al., 2002) e canais nucleotídeo cíclico (WIESNER et al., 2007). Na célula espermática, além desses canais que são localizados no flagelo, existem proteínas específicas que funcionam como canais iônicos: família CatSper, localizadas na peça principal do flagelo (CARISON et al., 2003); 2) Os canais de liberação de Ca<sup>2+</sup> com portões inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) que permitem a saída do íon do retículo endoplasmático e do acrossomo, nos espermatozoides (ALBERTS et al, 2004).

Os resultados de KRASZNAI e colaboradores (2000) indicam que o influxo de íons Ca<sup>2+</sup> através dos canais de Ca<sup>2+</sup> da membrana plasmática e o resultante aumento do Ca<sup>2+</sup>

intracelular são os eventos desencadeadores da iniciação da motilidade dos espermatozóides de peixe carpa *Cyprinus carpi*.

Alguns estudos mostram que esse íon desempenha um papel muito importante na regulação da motilidade espermática, principalmente no momento da fertilização (MARQUEZ et al., 2007). A elevação da sua concentração intracelular nesta célula está relacionada à: 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 espermatozóide no sítio de fertilização, podendo ser estimulada por hormônios, íons e secreções do fluido luminal do oviducto, dependendo da espécie. O íon  $\text{Ca}^{2+}$  tem-se mostrado como crucial para a iniciação e manutenção da motilidade hiperativada (HO e SUAREZ, 2001), que é caracterizada pela alta amplitude de inclinação flagelar, batimentos flagelares assimétricos, e trajetória circular ou irregular (YANAGIMACHI, 1994).

É importante ressaltar que espermatozóides hiperativados, antes de alcançarem o oviducto, são incapazes de fertilizar, porque um espermatozóide hiperativado é incapaz de passar do útero para o oviducto (SHALGI et al., 1992).

Então, a adição de cálcio ao diluidor de sêmen poderia aumentar a capacidade de fertilização dos espermatozóides em fertilização *in vitro* ou em processos de transferência de gametas intrafalopianos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar se diferentes tipos e concentrações de íons cálcio no diluidor BTS para sêmen suíno podem promover a hiperativação da célula espermática.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Local e animais experimentais

As coletas de sêmen foram realizadas na Granja Regina no município de Maranguape-Ce, utilizando-se quatro varrões da raça Dalland, com idade média entre 1,5 a 3 anos, mantidos sob o mesmo regime de estabulação e manejo alimentar (dois quilos de concentrado/dia). Em seguida, as amostras foram transportadas em caixa térmica para o Laboratório de Reprodução Suína e Tecnologia de Sêmen (LRSTS) da FAVET-UECE, onde

foram acondicionadas em refrigerador a 17°C. As análises microscópicas de morfologia e viabilidade espermática foram realizadas no Laboratório de Reprodução de Carnívoros (LRC) da FAVET-UECE. As análises computadorizadas das amostras foram realizadas no Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino (LTSCO) da FAVET-UECE.

### **Coleta e avaliação do sêmen**

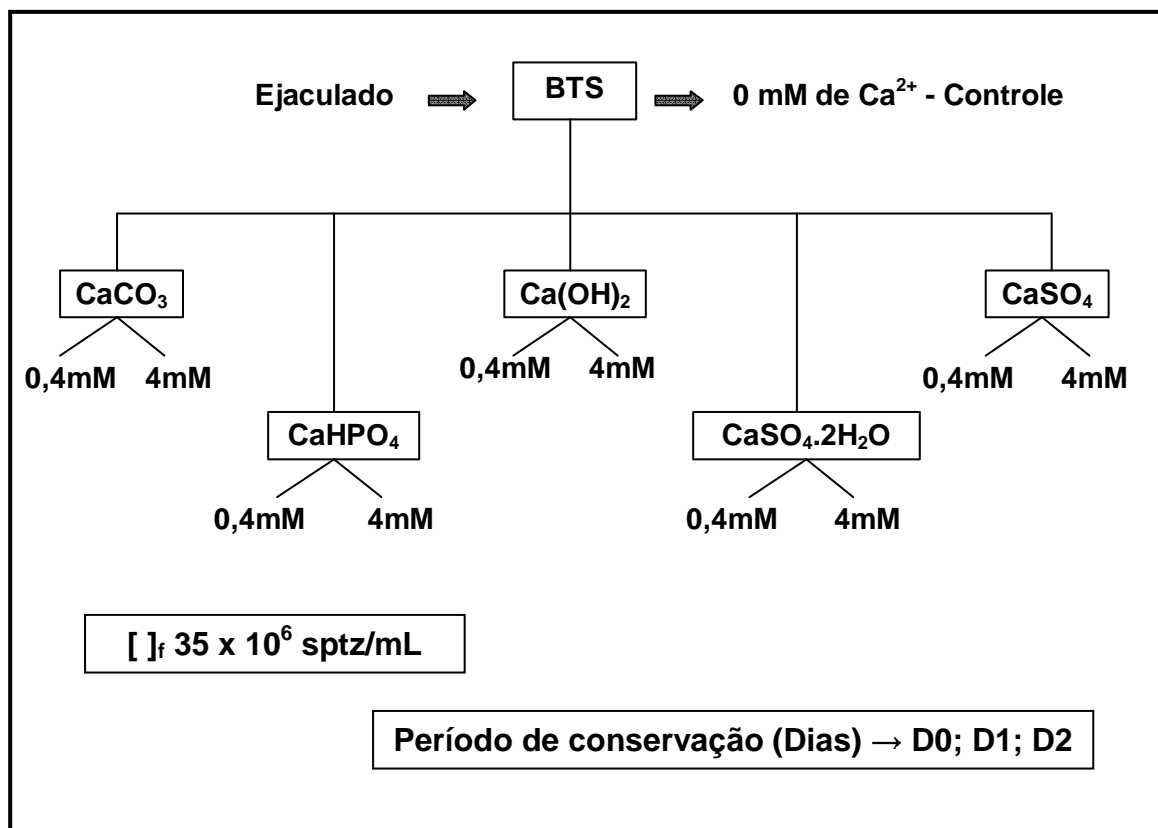
O sêmen dos reprodutores suínos foi coletado uma vez por semana, durante dez semanas consecutivas, por meio da técnica da mão enluvada em recipiente com capacidade de 600 mL, coberto por gaze e protegido em copo térmico de coleta. Foi utilizado o ejaculado total de cada reprodutor após a separação da parte gelatinosa. O ejaculado, após a coleta, foi levado ao laboratório da granja para avaliação da concentração, volume, total de espermatozóides, temperatura, vigor e motilidade espermática, utilizando-se microscópio óptico com aumento de 200x. Somente ejaculados com valores  $\geq 80\%$  de motilidade foram processados.

### **Delineamento experimental**

No experimento, foram testadas, individualmente, cinco formas de cálcio adicionadas ao diluidor BTS – *Betsville Thawing Solution* (BTS puro – controle) em quatro concentrações diferentes. (Figura 1).

Cada jaculado foi dividido em 11 tratamentos diluídos para uma concentração final de  $35 \times 10^6$  spz/ml para cada tratamento. As amostras de cada tratamento foram colocadas em tubos de ensaio de 3 ml, que correspondem, individualmente, a cada um dos dias de análise (D0, quatro horas após o acondicionamento a 17°C; D1 e D2), e conservadas a uma temperatura entre 15 e 17°C. Em cada dia de análise, foram retirados os tubos equivalentes a cada macho e cada diluidor para serem incubados em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Após o período de incubação, foi realizada a análise computadorizada da motilidade espermática com auxílio de um microscópio de contraste de fases acoplado a uma vídeo-câmera adaptada ao sistema *Sperm Class Analyser*<sup>®</sup> (SCA, Microptic S.L., versão 3.2.0).

Para a análise, cinco  $\mu\text{l}$  da amostra foram colocados em uma Câmara de Makler<sup>®</sup> (Sel-Medical Instruments), previamente aquecida a 37°C, sendo avaliados, então, os parâmetros de velocidade média da trajetória dos espermatozóides rápidos (VAP,  $\mu\text{m/s}$ ), linearidade (LIN, %), frequência de batimento cruzado (BCF, Hz) e porcentagem dos espermatozóides móveis.



**Figura 1.** Constituição dos tratamentos de cálcio em função da concentração e do período de conservação.

### **Avaliação dos espermatozóides vivos/mortos e morfologia espermática**

De cada tratamento, foram realizados dois esfregaços de sêmen, a fim de se proceder à análise da porcentagem de células vivos/mortos e morfologia espermática. As amostras de sêmen para os esfregaços foram feitas sempre aos 10 minutos de incubação, realizadas nos seguintes dias de conservação: no D0 (dia da coleta, quatro horas após o acondicionamento a 17°C) e D2 (último dia de conservação). 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 foi formada por 0,1 g de azul de bromofenol; 0,4 g de citrato de sódio e 10 mL de água destilada. A osmolaridade da solução foi medida e, quando necessário, ajustada com água destilada até ficar entre 300 e 310 mOsm. A solução foi guardada em geladeira a 17°C. Na preparação do esfregaço, juntou-se uma gota de sêmen com outra de corante, à mesma temperatura, e homogenizou-se. Após 30 segundos, retirou-se uma gota dessa mistura e realizou-se o esfregaço que permaneceu em temperatura ambiente antes da análise. Segundo

a qualidade acrossômica, os espermatozóides foram classificados em 2 categorias diferentes (DERIVAUX, 1980, citado por MEDEIROS et al., 2006):

- 1) Espermatozóides vivos com acrossoma intacto, não corados;
- 2) Espermatozóides mortos, corados.

Segundo a morfologia, os espermatozóides foram classificados em seis categorias diferentes de acordo com BORTOLOZZO e colaboradores (2005):

- 1) Normal;
- 2) Cabeça alterada;
- 3) Acrossomo alterado;
- 4) Peça intermediária alterada;
- 5) Cauda alterada;
- 6) Presença de gota citoplasmática proximal.

### **Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso. Na análise estatística os dados foram expressos na forma de média e erro padrão, e posteriormente submetidos a análise de variância, primeiramente, aplicou-se GLM (Modelo Linear Geral), uma análise de variância multifatorial e, posteriormente, o teste de Tukey para comparações entre os dias de análises dos tratamentos e para comparação entre os tratamentos. Utilizou-se o programa de estatística Systat 7.0. Considerou-se diferença estatística quando  $P < 0,05$ .

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Coleta e avaliação do sêmen a fresco**

Para o experimento, foi utilizado um total de vinte ejaculados, tendo-se como médias de todos os ejaculados para os parâmetros avaliados: Temperatura (°C):  $36,1 \pm 0,1$ ; concentração ( $\times 10^6$  sptz/mL):  $382 \pm 17$ ; volume (mL):  $332,5 \pm 11,4$ ; total de espermatozóides ( $\times 10^9$  sptz):  $126,0 \pm 6,0$ ; vigor espermático:  $4,3 \pm 0,1$  e motilidade espermática (%):  $93 \pm 1$ .

### **Avaliação computadorizada**

Os valores percentuais médios dos espermatozóides móveis das amostras que receberam diferentes concentrações de carbonato de cálcio -  $\text{CaCO}_3$ , hidróxido de cálcio -  $\text{Ca(OH)}_2$ , fosfato dibásico anidro de cálcio ( $\text{CaHPO}_4$ ), sulfato diidratado de cálcio ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) e sulfato anidro de cálcio ( $\text{CaSO}_4$ ), estão representados na Tabela 1.

Somente as amostras que receberam 4 mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  tiveram valores de espermatozóides móveis significativamente maiores que o controle (0 mM-BTS) nos dias 0, 1 e 2 de análise. As amostras que receberam 0,4 e 4 mM de  $\text{CaCO}_3$  e  $\text{Ca(OH)}_2$ , e 0,4mM  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  de não diferiram do controle durante os dias de análise.

Os valores médios de VAP (velocidade média da trajetória), LIN (linearidade) e BCF (frequência de batimento cruzado) dos espermatozóides rápidos das amostras, que receberam diferentes concentrações de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$ , estão representados na Tabela 2.

As amostras que receberam 0,4 e 4 mM de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  tiveram os valores de VAP significativamente maiores que o controle (0 mM-BTS) no dia 0 de análise, apenas as amostras que receberam 0,4 e 4 mM de  $\text{Ca(OH)}_2$  não diferiram do controle. No dia 1, apenas as amostras que receberam 0,4 e 4mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  tiveram valores de VAP significativamente superiores ao controle (0 mM-BTS). Somente as amostras que receberam 4 mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  tiveram valores de VAP significativamente maiores que o controle (0 mM-BTS) no dia 2 de análise.

De acordo com SUAREZ (1996) o principal método de determinação da hiperativação é a avaliação pelo sistema de análise computadorizado que permite analisar as características seminais mais precisamente, observando a redução da linearidade espermática, o aumento do batimento flagelar assimétrico e o aumento da velocidade média da trajetória. 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* (GADEA, 2005).

As amostras que receberam 0,4 e 4 mM de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  tiveram os valores de BCF significativamente maiores que o controle (0 mM-BTS) no Dia 0 de análise. No dia 1, apenas as amostras que receberam 0,4 e 4mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  tiveram valores de BCF significativamente superiores ao controle (0 mM-BTS). Somente as amostras que receberam 4 mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  tiveram valores de BCF significativamente maiores que o controle (0 mM-BTS) no dia 2 de análise.

Pode-se observar que, nos dias 0, 1 e 2 de análise, todas as amostras que receberam 0,4 e 4 mM de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  tiveram os valores de LIN significativamente menores que o controle (0 mM-BTS). Essa redução da linearidade, associada ao aumento da velocidade média da trajetória e da frequência de batimento cruzado, gerada pela adição de íons  $\text{Ca}^{2+}$  ao meio, está relacionada à hiperativação das células espermáticas.

A linearidade de 34% tem sido o limite inferior dos espermatozóides não humanos hiperativados *in vivo* (KATZ e YANAGIMACHI, 1980). Já MORTIMER e colaboradores (1998) consideraram que, com Linearidade  $\leq 50\%$ , os espermatozóides são considerados hiperativados. 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 e colaboradores. (1988). O grupo de espermatozóides 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). Essa fase transitória entre a ativação e hiperativação tem sido registrada por muitas espécies, incluindo espermatozóide humano (MORTIMER e MORTIMER, 1990). Os espermatozóides não hipertivados são caracterizados por LIN de  $53 \pm 37\%$  e BCF de  $5,3 \pm 5,2 \text{ Hz}$  (ROBERTSON et al., 1988). Os resultados encontrados no presente trabalho mostraram uma redução da linearidade das amostras ( $\leq 35\%$ ), caracterizando uma hiperativação de acordo com os autores já citados.

Observou-se, também, que, em cada concentração de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$ ) e no controle, houve uma redução progressiva de VAP, LIN e BCF ao longo dos tempos de análise (D0, D1 e D2).

**Tabela 1.** Valores percentuais médios  $\pm$  SEM para os espermatozóides móveis das amostras com diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.

TRAT	CONC de Ca <sup>2+</sup> (mM)	MÓVEIS % (DIA)		
		D0	D1	D2
BTS*	0	42,9 $\pm$ 5,7 a A	22,9 $\pm$ 5,0 b A	4,4 $\pm$ 1,0 c A
	0,4	50,7 $\pm$ 5,0 a A	23,4 $\pm$ 5,0 b A	7,8 $\pm$ 2,7 c A
CaCO <sub>3</sub>	4	57,3 $\pm$ 6,0 a A	30,2 $\pm$ 6,9 b A	10,7 $\pm$ 2,2 c A
	0,4	51,8 $\pm$ 5,4 a A	25,3 $\pm$ 5,7 b A	6,7 $\pm$ 1,4 c A
Ca(OH) <sub>2</sub>	4	45,2 $\pm$ 6,3 a A	12,2 $\pm$ 3,6 b A	6,2 $\pm$ 1,1 b A
	0,4	41,4 $\pm$ 6,2 a A	17,2 $\pm$ 4,0b A	5,0 $\pm$ 0,5 b A
CaHPO <sub>4</sub>	4	69,2 $\pm$ 5,3 a B	60,1 $\pm$ 5,7a B	37,3 $\pm$ 7,3 b B
	0,4	44,3 $\pm$ 6,3 a A	15,4 $\pm$ 3,9 b A	7,2 $\pm$ 1,7 b A
CaSO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	4	75,4 $\pm$ 2,9 a B	64,0 $\pm$ 6,2a B	28,4 $\pm$ 5,9 b B
	0,4	43,0 $\pm$ 7,3 a A	23,2 $\pm$ 5,9 a,b A	12,8 $\pm$ 5,0 b A
CaSO <sub>4</sub>	4	65,1 $\pm$ 4,5 a B	63,6 $\pm$ 6,7 a B	41,5 $\pm$ 7,0 b B

\* Grupo controle

a,b,c,d comparação na mesma linha em cada parâmetro avaliado

ABCD comparação entre os tratamentos de um mesmo sal na mesma coluna e o controle para os parâmetros avaliados (P < 0.05)

**Tabela 2.** Valores médios  $\pm$  SEM para VAP (velocidade média da trajetória), LIN (linearidade) e BCF (frequência de batimento cruzado) das amostras com diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.

TRAT	CONC de Ca <sup>2+</sup> (mM)	VAP** ( $\mu$ m/s)			LIN*** (%)			BCF**** (Hz)		
		D0	D1	D2	D0	D1	D2	D0	D1	D2
BTS*	0	40,6 $\pm$ 1,3a A	31,5 $\pm$ 4,0b A	10,7 $\pm$ 3,0c A	50,1 $\pm$ 1,7a A	45,3 $\pm$ 3,6b A	30,0 $\pm$ 2,3b A	5,3 $\pm$ 0,4 a A	4,0 $\pm$ 0,5 b A	1,2 $\pm$ 0,5c A
	0,4	49,1 $\pm$ 1,4a B	35,4 $\pm$ 3,8b A	13,7 $\pm$ 2,8c A	35,8 $\pm$ 1,7a B	23,4 $\pm$ 3,4b B	18,6 $\pm$ 2,7b B	8,4 $\pm$ 0,4a B	4,2 $\pm$ 0,4b A	2,0 $\pm$ 0,7c A
CaCO <sub>3</sub>	4	45,1 $\pm$ 1,2a B	30,6 $\pm$ 4,0b A	17,6 $\pm$ 3,7c A	39,7 $\pm$ 2,0a B	24,6 $\pm$ 2,9b B	15,2 $\pm$ 3,0c B	7,8 $\pm$ 0,3a B	4,4 $\pm$ 0,3b A	2,5 $\pm$ 0,8c A
	0,4	39,7 $\pm$ 1,4a A	29,0 $\pm$ 3,4b A	10,4 $\pm$ 2,9c A	35,8 $\pm$ 1,2a B	28,3 $\pm$ 2,3a B	11,9 $\pm$ 3,0b B	8,2 $\pm$ 0,4a B	4,2 $\pm$ 0,3b A	1,7 $\pm$ 0,6c A
Ca(OH) <sub>2</sub>	4	37,5 $\pm$ 3,2a A	26,7 $\pm$ 3,4b A	8,8 $\pm$ 3,0b A	39,4 $\pm$ 3,0a B	27,5 $\pm$ 2,8b B	8,0 $\pm$ 2,4c B	6,3 $\pm$ 0,7a A	3,4 $\pm$ 0,6b A	1,2 $\pm$ 0,4b A
	0,4	47,4 $\pm$ 2,3a B	40,2 $\pm$ 3,2b B	4,9 $\pm$ 1,5c A	43,7 $\pm$ 1,8a B	27,5 $\pm$ 2,8b B	7,3 $\pm$ 2,2c B	7,9 $\pm$ 0,5a B	5,2 $\pm$ 0,2b B	0,3 $\pm$ 0,1c A
CaHPO <sub>4</sub>	4	50,0 $\pm$ 1,9a B	38,0 $\pm$ 1,1ab B	30,7 $\pm$ 3,3b B	37,8 $\pm$ 1,2a B	33,0 $\pm$ 1,1a B	16,5 $\pm$ 2,3b B	8,4 $\pm$ 0,4a B	7,6 $\pm$ 0,5ab B	5,6 $\pm$ 0,8b B
	0,4	48,0 $\pm$ 2,0a B	42,4 $\pm$ 3,7b B	10,4 $\pm$ 3,0c A	33,7 $\pm$ 1,9a B	28,8 $\pm$ 3,3b B	13,3 $\pm$ 2,7c B	8,0 $\pm$ 0,5a B	5,0 $\pm$ 0,1b B	1,7 $\pm$ 0,6b A
CaSO <sub>4</sub> .2 H <sub>2</sub> O	4	47,0 $\pm$ 1,5a B	41,4 $\pm$ 3,3a B	25,2 $\pm$ 3,2b B	38,4 $\pm$ 1,1a B	31,6 $\pm$ 2,7a B	16,7 $\pm$ 2,0b B	8,6 $\pm$ 0,3a B	7,0 $\pm$ 0,6a B	4,5 $\pm$ 0,8b B
	0,4	45,2 $\pm$ 2,7a B	40,8 $\pm$ 2,2a B	13,5 $\pm$ 3,4b A	30,9 $\pm$ 2,5a B	25,6 $\pm$ 3,5a B	13,3 $\pm$ 2,7b B	6,7 $\pm$ 0,7a B	6,0 $\pm$ 1,0a B	1,7 $\pm$ 0,7b A
CaSO <sub>4</sub>	4	46,5 $\pm$ 1,2a B	42,5 $\pm$ 1,6a B	33,9 $\pm$ 3,8b B	42,5 $\pm$ 2,9a B	33,4 $\pm$ 1,2a B	17,3 $\pm$ 2,5b B	8,4 $\pm$ 0,3a B	7,4 $\pm$ 0,4a B	5,0 $\pm$ 0,8b B

\* Grupo controle; \*\* Velocidade média da trajetória; \*\*\* Linearidade; \*\*\*\* Frequência de Batimento Cruzado  
a,b,c,d comparação na mesma linha em cada parâmetro avaliado

ABCD comparação entre os tratamentos de um mesmo sal na mesma coluna e o controle para os parâmetros avaliados.  
(P < 0.05)

STAUSS et al. (1995) utilizou um meio de capacitação que continha 2,4mM de CaCl<sub>2</sub>. Também demonstrou que a hiperativação de espermatozoides de camundongos foi suprimida após ter sido iniciada por meio do uso de antagonistas dos canais de cálcio, por exemplo o cádmio, e que ela ofereceu vantagem na penetração da zona pelúcida do oócito. SUAREZ E 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 2,5Mm de CaCl<sub>2</sub>. Assim, a hiperativação seria uma vantagem para o movimento dos espermatozoides por meio do fluido viscoso do oviducto, muco viscoelástico do oviducto e matrix viscoelástica do *cumulus*.

A hiperativação tem sido associada com o alcance da capacidade para fertilização *in vitro* (SUAREZ et al., 1993). BURKMAN (1984) observou que espermatozoides de humanos exibem motilidade hiperativada quando incubados dentro de condições capacitantes *in vitro*.

CANCEL e colaboradores (2000) determinaram que espermatozóides caracterizados como hiperativados são importantes para estudos com FIV (fertilização *in vitro*) em camundongos.

### **Avaliação dos espermatozóides vivos/mortos**

Os valores médios percentuais de espermatozóides 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: D0 e D2, estão representados na Tabela 3. Nas análises do D0 e D2, não houve diferenças significativas entre os valores encontrados nas diferentes concentrações (0,4 e 4 mM) de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  e no controle BTS (0 mM).

Observou-se, também, que, em cada concentração de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$ ) e no controle, os valores de vivos encontrados no dia 0 foram significativamente maiores do que os valores de vivos, no dia 2 ( $P < 0,05$ ).

Embora esses sais tenham exercido efeito sobre a motilidade espermática, linearidade e frequência de batimento cruzado, os mesmos não foram capazes de alterar a viabilidade espermática. Provavelmente, as amostras que receberam 0,4 e 4 mM de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$  podem ter perdido a capacidade de motilidade após um dia de acondicionamento. No reprodutor suíno, as modificações da permeabilidade de membrana aos íons e, em particular, ao cálcio seriam responsáveis pela mudança da motilidade dos espermatozóides (DARSZON et al., 1999), ou seja, modificações bioquímicas importantes para a função normal dos espermatozóides (NISHIMURA, 1993).

**Tabela 3.** Valores percentuais médios  $\pm$  SEM para espermatozóides vivos das amostras nas diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.

TRAT	CONC de Ca <sup>2+</sup> (mM)	VIVOS % (DIA)	
		D1	D2
BTS*	0	78,5 $\pm$ 2 aA	60,0 $\pm$ 2,5 bB
CaCO <sub>3</sub>	0,4	80,0 $\pm$ 1,5 aA	64 $\pm$ 2 bB
	4	80,5 $\pm$ 1,5 aA	56,5 $\pm$ 2 bB
Ca(OH) <sub>2</sub>	0,4	81,5 $\pm$ 1,5 aA	55,0 $\pm$ 1,5 bB
	4	79,0 $\pm$ 1,5 aA	54,0 $\pm$ 3 bB
CaHPO <sub>4</sub>	0,4	77,5 $\pm$ 2 aA	58,0 $\pm$ 2 bB
	4	80,0 $\pm$ 2 aA	56,0 $\pm$ 2 bB
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,4	83,0 $\pm$ 1,5 aA	59,5 $\pm$ 1,5 bB
	4	84,0 $\pm$ 1,5 aA	56,5 $\pm$ 2,5 bB
CaSO <sub>4</sub>	0,4	81,0 $\pm$ 2 aA	60,0 $\pm$ 2 bB
	4	81,0 $\pm$ 1,5 aA	56,5 $\pm$ 2 bB

\* Grupo controle

a,b,c,d comparação na mesma linha em cada parâmetro avaliado

ABCD comparação entre os tratamentos de um mesmo sal na mesma coluna e o controle para os parâmetros avaliados.

(P < 0.05)

### Morfologia espermática

Os valores médios percentuais dos espermatozóides com morfologia normal 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: D0 e D2, estão representados na Tabela 4.

Nas análises do D0 e D2, não houve diferenças significativas entre os valores percentuais de espermatozóides normais encontrados nas diferentes concentrações (0,4 e 4 mM) de CaCO<sub>3</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, CaHPO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e CaSO<sub>4</sub> e no controle BTS (0 mM). Observou-se, também, que, no controle BTS e nas concentrações de 0,4 e 4 mM de cálcio (CaCO<sub>3</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, CaHPO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e CaSO<sub>4</sub>) no D0 e D2, não houve diferenças significativas para os valores de espermatozóides normais. Também foram encontrados valores percentuais para algumas alterações morfológicas: 1% cabeça alterada, 5 a 10% acrossomo alterado, 3 a 7% peça intermediária alterada, 8 a 13% cauda alterada e 2 a 6% de gota citoplasmática proximal em todos os tratamentos, ressaltando-se que não houve diferenças significativas entre os valores encontrados nas diferentes concentrações (0,4 e 4 mM) de CaCO<sub>3</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>, CaHPO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e CaSO<sub>4</sub> e no controle BTS (0 mM). Entre as alterações de cabeça, destacou-se cabeça globosa e piriforme; de acrossomo, acrossomo difuso; de peça intermediária, peça intermediária dobrada na base; de cauda, cauda dobrada e cauda fortemente enrolada.

Assim, pode-se afirmar que, embora esses sais tenham exercido efeito sobre a motilidade espermática, linearidade e frequência de batimento cruzado, não foram capazes de alterar a morfologia da célula espermática.

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

**Tabela 4.** Valores percentuais médios  $\pm$  SEM de espermatozóides normais das amostras nas diferentes concentrações de Carbonato de Cálcio, Hidróxido de Cálcio, Fosfato dibásico anidro de Cálcio, Sulfato diidratado de Cálcio e Sulfato anidro de Cálcio.

TRAT	CONC de Ca <sup>2+</sup> (mM)	NORMAIS (DIA)	
		D1	D2
BTS*	0	87,0 $\pm$ 1,5 aA	84,0 $\pm$ 2 bB
CaCO <sub>3</sub>	0,4	87,0 $\pm$ 2 aA	84,5 $\pm$ 2 bB
	4	86,0 $\pm$ 1,5 aA	85,0 $\pm$ 1,5 bB
Ca(OH) <sub>2</sub>	0,4	87,5 $\pm$ 1,5 aA	84,0 $\pm$ 2 bB
	4	86,0 $\pm$ 1 aA	85,5 $\pm$ 1,5 bB
CaHPO <sub>4</sub>	0,4	88,0 $\pm$ 2 aA	84,5 $\pm$ 2 bB
	4	87,0 $\pm$ 2 aA	84,5 $\pm$ 2 bB
CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,4	84,5 $\pm$ 2 aA	86,0 $\pm$ 1,5 bB
	4	87,0 $\pm$ 1,5 aA	84,0 $\pm$ 2 bB
CaSO <sub>4</sub>	0,4	85,0 $\pm$ 1,5 aA	85,0 $\pm$ 1,5 bB
	4	87,0 $\pm$ 1,5 aA	84,0 $\pm$ 2 bB

\* Grupo controle

a,b,c,d comparação na mesma linha em cada alteração morfológica avaliada.

ABCD comparação entre os tratamentos de um mesmo sal na mesma coluna e o controle para morfologia normal.

(P < 0,05)

## CONCLUSÃO

A adição de 4 mM de CaHPO<sub>4</sub>, CaSO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O e CaSO<sub>4</sub> 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 espermatozóides em fertilização *in vitro* ou em processos de transferência de gametas intrafalopianos. Assim, estudos são necessários para verificar a sua eficiência.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à CAPES, ao CNPq e à FUNCAP pelo apoio financeiro; ao Prof. Dr. Airton Alencar de Araújo pela colaboração nas análises estatísticas, ao Laboratório de Reprodução de Carnívoros e Laboratório de Tecnologia do Sêmen Caprino e Ovino.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, p. 856 – 864, 2004.

BOOTMAN, M.P.; COOLLINS, 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.

BURKMAN, L.J. Characterization of hiperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligospermic sperm populations. **Arch Andrology**, v. 13, p. 153 – 165, 1984.

CATTERALL, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 493 – 531, 1995.

CANCEL, A.M.; LOBDELL, D.; MENDOLA, P.; PERREAULT, S.D. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1322 – 1328, 2000.

CARLSON, A.E.; WESTENBROEK, R.E.; QILL, T.; REN, D.; CLAPHAM, D.E.; HILLE, B.; GARBERS, D.; BABCOCK, D.F. CatSper 1 required for evoked  $Ca^{2+}$  entry and control of flagellar function in sperm. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 100, p. 14864 – 14868, 2003.

DARSZON, A.; LABARCA, P.; NISHIGAKI, T.; & ESPINOSA, F. Ion channels in sperm physiology. **Physiological reviews**, v. 79, p. 481 – 510, 1999.

GADEA, J. Sperma factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 431 – 444, 2005.

HO, H-C.; SUAREZ, S.S. An inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-gated intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  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.

KATZ, D.F.; YANAGIMACHI, R. Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 759 – 764, 1980.

KRASZNAI, Z.; MARIAN, T.; IZUMI, H.; DAMJANOVICH, S.; BALKAY, L.; TRON, L.; MORISAWA, M. Membrane hyperpolarization removes inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, leading to  $\text{Ca}^{2+}$  influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, p. 2052 – 2057, 2000.

MARQUEZ, B.; IGNOTZ, G.; SUAREZ, S.S. Contributions of extracellular and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  to regulation of sperm motility: release of intracellular stores can hyperactivate CatSper 1 and CatSper 2 null sperm. **Developmental Biology**, v. 303, p. 214 – 221, 2007.

MEDEIROS, A.A.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A.; CAVALCANTE, J. M. M.; FIGUEIREDO, E. L.; RODRIGUES, L.R.S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4° e 29°C como método de coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. **Revista Ciências Agrárias**, nº 46, p. 287 – 297, 2006.

MORTIMER, S.T.; MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 195 – 203, 1990.

MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2139 – 2146, 1998.

NISHIMURA, K. Effect of calcium ions on the malate-aspartate shuttle in slow-cooled boar spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 537 – 543, 1993.

PITCHER, J.A.; FREEDMAN, N.J.; LEFKOWITZ, R.J. G protein-coupled receptor kinases. **Annual Reviews Biochem.**, v. 67, p. 653 – 692, 1998.

ROBERTSON, L.; WOLF, D.P.; TASH, J.S. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 797 – 805, 1988.

SHALGI, R.; SMITH, T.T.; YANAGIMACHI, R. A quantitative passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through uterotubal junction. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 419 – 424, 1992.

STAUSS, C.R.; VOTTA, T.J.; SUAREZ, S.S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v. 53, p. 1280 – 1285, 1995.

SUAREZ, S.S.; DAI, X. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 686 – 691, 1992.

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.

SUAREZ, S.S. Hyperactivated motility in sperm. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 331 – 335, 1996.

VINES, C.A.; YOSHIDA, K.; GRIFFIN, F.J.; PILLAI, M.C.; MORISAWA, M.; YANAGIMACHI, R.; CHERR, G.N. Motility initiation in herring sperm is regulated by reverse sodium-calcium exchange. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 2036 – 2031, 2002.

WIESNER, B.; WEINER, J.; MIDDENDORFF, R.; HAGEN, V.; KAUPP, U.B.; WEYAND, I. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control  $Ca^{2+}$  entry into sperm. **The Journal of Cell Biology**, v. 142, p. 473 – 484, 2007.

YANAGIMACHI, R. **The physiology of reproduction**. New York: Raven Press, p.189 – 317. 1994.

## 8. CONCLUSÕES GERAIS

1. Os sais de cálcio (0,4 e 4mM de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$ ; 40 e 400mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$ ) quando adicionados ao diluidor BTS geraram, a partir do primeiro dia, alterações no vigor e na motilidade dos espermatozoides suínos e não exerceram efeito negativo sobre a membrana espermática.

2. A adição de 4 mM de  $\text{CaHPO}_4$ ,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{CaSO}_4$  ao diluidor BTS para sêmen suíno gerou a hiperativação das células espermáticas e não exerceu efeito negativo sobre a membrana espermática.

## **9. PERSPECTIVAS**

A adição dos sais de cálcio ao diluidor de sêmen por promover a hiperativação das células espermáticas poderia aumentar a capacidade fertilizante dos espermatozóides em fertilização *in vitro* ou em processos de transferência de gametas intrafalopianos. Assim, estudos são necessários para verificar a sua eficiência.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAIGAR, T.; HOLT, W. V.; HARRISON, R. A.; DEL BARRIO, G. Sperm subpopulation in boar (*Sus scrofa*) and gazelle (*Gazelle dama mhor*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. **Biology of Reproduction**, v. 60, p. 32 – 41, 1999.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 4ª edição. Porto Alegre: Artmed, p. 856 – 864, 2004.

ALLBRITTON, N.L.; MEYER, T.; STRYER, L. Range of messenger action of calcium-ion and inositol 1,4,5-triphosphate. **Science**, v. 258, p. 1812 – 1815, 1992.

AMANN, R.P.; KATZ, J. Quantization of specific parameters of motility in large numbers of human sperm by digital image processing. **Biology of Reproduction**, v. 25, p. 317 – 325, 2004.

APARICIO, I.M.; GIL, M.C.; GARCIA-HERREROS, M.; PEÑA, F.J.; GARCIA-MARIN, L.J. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase modifies boar sperm motion parameters. **Reproduction**, v. 129, p. 283 – 289, 2005.

APPELL, R.A.; EVANS, P. R.; BLANDY, J. P. The effect of temperature on the motility and viability of sperm. **British Journal of Urology**, v. 49, n. 7, p. 751 – 756, 1977.

ARNOULT, C.; ZENG, Y.; FLORMAN, H.M. ZP3-dependent activation of sperm cation channels regulates acrosomal secretion during mammalian fertilization. **The Journal Cell Biology**, v. 134, p. 637 – 645, 1996.

BABCOCK, D.F.; PFEIFFER, D.R.; Independent elevation of cytosolic  $[Ca^{2+}]$  and pH of mammalian sperm by voltage-dependent and pH-sensitive mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, p. 15041 – 15047, 1987.

BALDI, E.; CASANO, M.; FALSETTI, C.; KRAUSZ, C.; FORTI, G. Intracellular calcium accumulation and responsiveness to progesterone in capacitating human spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 12, p. 323 – 330, 1991.

BERRIDGE, M.J.; & IRVINE, R.F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. **Nature**, v. 312, p. 315 – 321, 1984.

BERRIDGE, M.J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**, v. 361, p. 315 – 325, 1993.

BERRIDGE, M.J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M.D.; The versatility and universality of calcium signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, p. 11 – 21, 2000.

BLAUSTEIN, M.P.; LEDERER, W.J. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. **Physiological Reviews**, v. 79, 763 – 854, 1999.

BOOTMAN, M.D.; COLLINS, T.J.; PEPPIATT, C.M.; PROTHERO, L.S.; MACKENZIE, L.; DE SMET, P.; TRAVERS, M.; TOVEY, S.C.; SEO, J.T., BERRIDGE, M.J.; CICCOLINI, F.; LIPP, P. Calcium signalling – an overview. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 12, p. 3 – 10, 2001.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRS, F.M.; NETO, G.B. Exame do ejaculado. Em: **Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Pallotti, p. 80 – 85, 2005.

BORTOLOZZO, F.P.; WENTZ, I.; BENNEMANN, P.E.; BERNARDI, M.L.; WOLLMANN, E.B.; FERREIRS, F.M.; NETO, G.B. Processo e armazenamento das doses inseminantes. Em: **Suinocultura em ação: Inseminação artificial na suinocultura tecnificada**. Porto Alegre: Pallotti, p. 100 – 101, 2005.

BOYER, S.P.; DAVIS, R.O.; KATZ, D.F. Automated semen analysis. **Current problems in obstetrics, gynecology and fertility**, v. 12, p. 167 – 200, 1989.

BROKAW, C.J. Calcium sensors in sea urchin sperm flagella. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 18, p. 123 – 130, 1991.

BROKAW, C.J. Transient disruptions of axonemal structure and microtubule sliding during bend propagation by *Ciona* sperm flagella. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 37, p. 346 – 362, 1997.

BUDWORTH, P.R.; AMMANN, R.P. e HAMERSTED, R.H. A microcomputer photographic method for evaluation of motility and velocity in bull sperm. **Journal Dairy Science**, v. 70, p. 1927 – 1936, 1987.

BURKMAN, L.J. Characterization of hyperactivated motility by human spermatozoa during capacitation: comparison of fertile and oligozoospermic sperm populations. **Archives of Andrology**, v. 13, p. 153 – 165, 1984.

CANCEL, A.M.; LOBDELL, D.; MENDOLA, P.; PERREAULT, S.D. Objective evaluation of hyperactivated motility in rat spermatozoa using computer-assisted sperm analysis. **Human Reproduction**, v. 15, p. 1322 – 1328, 2000.

CARAFOLI, E. Intracellular calcium homeostasis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 56, p. 395 – 433, 1987.

CARLSON, A.E.; WESTENBROEK, R.E.; QILL, T.; REN, D.; CLAPHAM, D.E.; HILLE, B.; GARBERS, D., BABCOCK, D.F. CatSper 1 required for evoked Ca<sup>2+</sup> entry and control of flagellar function in sperm. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 100, p. 14864 – 14868, 2003.

CATTERALL, W.A. Structure and function of voltage-gated ion channels. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, p. 493 – 531, 1995.

CATTERALL, W.A. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. **Annual Review Cell Developmental Biology**, v. 16, p. 521 – 555, 2000.

CATTERALL, W.A.; STRIESSNIG, J.; SNUTCH, T.P.; PEREZ-REYES, A. Compendium of voltage-gated ion channels: calcium channels. **Pharmacological Reviews**, v. 55, p. 579 – 581, 2003.

CHEUNG, W.Y. Calmodulin plays a pivotal role in cellular regulation. **Science**, v. 207, p. 19 – 27, 1980.

CHINOY, N.J.; VERNIA, R.J., PATEL, K.G. Effect of calcium on sperm motility of cauda epididymis in vitro. **Acta Eur Fertil**, v. 14, p. 421 – 423, 1983.

CÔRREA, M.N.; MEINCKE, W.; JÚNIOR, T.L.; DESCHAMPS, J.C. Fisiologia e manejo reprodutivo do macho suíno. Em: **Inseminação artificial em suínos**. Pelotas, p. 13 – 33, 2001.

COX, J.F.; ALFARO, V.; MONTENEGRO, V. e RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Computer-assisted analysis of sperm motion in goats and its relationship with sperm migration in cervical mucus. **Theriogenology**, v.66, p. 860 – 867, 2006.

DARSZON, A.; LABARCA, P.; NISHIGAKI, T.; & ESPINOSA, F. Ion channels in sperm physiology. **Physiological reviews**, v. 79, p. 481 – 510, 1999.

DAVIS, R. O.; KATZ, D. F. Standardization and comparability of CASA instruments. **Journal of Andrology**, v. 13, p. 81, 1992.

DEDMAN, J.R.; POTTERS, J.D.; JACKSON, R.L.; JOHNSON, J.D.; MEANS, A.R. Physicochemical properties of rat testis Ca<sup>2+</sup>-dependent regulator protein of cyclic nucleotide phosphodiesterase. Relationship Ca<sup>2+</sup>-binding, conformational changes, and phosphodiesterase activity. **The Journal Biological Chemistry**, v. 252, p. 8415 – 8422, 1977.

DOWDEN, J.; BERRIDGE, G.; MOREAU, C.; YAMASAKI, M.; CHURCHILL, G.C.; POTTER, B.V.L., GALIONE, A. Cell-permeant small-molecule modulators of NAADP-mediated Ca<sup>2+</sup> release. **Chemistry & Biology**, v. 13, p. 659 – 665, 2006.

ERIKSSON, B. M.; VAZQUEZ, J. M.; MARTINEZ, E. A.; ROCA, J.; LUCAS, X.; MARTINEZ-RODRIGUES, H. Effects of holding time during cooling and of type of package on plasma membrane integrity, motility and *in vitro* oocyte penetration ability of frozen-thawed boar spermatozoa. **Theriogenology**, v. 55, p. 1593 – 1605, 2001.

FOOT, R. H.; BRATTON, R. W.; Survival of bovine spermatozoa stored at 5 and 25°C in extenders containing varying levels of egg yolk, glucose, glycine, glycerol, citrate, and other salts. **Journal of Dairy Science**, v. 43, p. 1322 – 1329, 1960.

FRASER, L.R. Motility patterns in mouse spermatozoa before and after capacitation. **Journal Experimental Zoology**, v. 202, p. 439 – 444, 1977.

FRASER, L.R. Minimum and maximum extracellular  $Ca^{2+}$  requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 81, p. 77 – 89, 1987.

GADAE, J. Sperma factors related to *in vitro* and *in vivo* porcine fertility. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 431 – 444, 2005.

GARBERS, D.L. Swimming with sperm. **Nature**, v. 413, p. 579 – 582, 2001.

GIESEN, A. F.; SEXTON, T. J.; Beltsville poultry semen extender. 9. Effect of storage temperature on turkey semen held 18 hours. **Poultry Science**, v. 62, p. 1305 – 1311, 1983.

GILMAN, A.G., RALL, T.W., NIES, A.S., TAYLOR, P. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Granabara Koogan, p. 1232 1991.

HAFEZ, B. HAFEZ, E.S.E. Anatomia da reprodução masculina. Em: **Reprodução Animal**. Sétima edição. Barueri, SP: Manole, p. 3 – 12, 2004.

HEFFNER, L.J.; STOREY, B.T. The role of calcium in maintaining motility in mouse spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 218, p. 424 – 434, 1981.

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.

HO, H-C., GRANISH, K.A., SUAREZ, S.S. Hyperactivated motility of bull sperm is triggered at the axoneme by  $\text{Ca}^{2+}$  and not cAMP. **Developmental Biology**, v. 250, p. 208 – 217, 2002.

HONG, C.Y.; CHIANG, B.N.; TURNER, P. Calcium ion is the key regulator of human sperm function. **Lancet**, v. 2, p. 1449 – 1451, 1984.

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.

KATZ, D.F.; YANAGIMACHI, R. Movement characteristics of hamster spermatozoa within the oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 22, p. 759 – 764, 1980.

KHAN, S.Z.; DYER, J.L.; MICHELANGELI, F. Inhibition of type 1 inositol 1,4,5-triphosphate-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channel by calmodulin antagonists. **Cellular Signalling**, v. 13, p. 57 – 63, 2001.

KIRICHOK, Y.; NAVARRO, B.; CLAPHAM, D.E. Whole-cell patch-clamp measurements of spermatozoa reveal an alkaline-activated  $\text{Ca}^{2+}$  channel. **Nature Publishing Group**, v. 439, p. 737 – 740, 2006.

KRASZNAI, Z.; MARIAN, T.; IZUMI, H.; DAMJANOVICH, S.; BALKAY, L.; TRON, L.; MORISAWA, M. Membrane hyperpolarization removes inactivation of  $\text{Ca}^{2+}$  channels, leading to  $\text{Ca}^{2+}$  influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 97, p. 2052 – 2057, 2000.

KURODA, Y.; KANEKO, S.; YOSHIMURA, Y.; NOZAWA, S.; & MIKOSHIBA, K. Are there inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) receptors in human sperm? **Life Science**, v. 65, p. 135 – 143, 1999.

LEEuw, F. E.; COLENBRANDER, B.; VERKLEU, A. J.; The hole membrane damage plays in cold shock and freezing injury. **Reproduction in Domestic Animals**, Supplement, v. 1, p. 95 – 104, 1991.

LIMA, F. P. **Efeito da adição de cloreto de cálcio sobre a qualidade espermática de semên resfriado de suíno**. 2006. p. 14 – 35. Dissertação (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.

MEDEIROS, A.A.; ARAÚJO, A.A.; MOURA, A.A.A.; CAVALCANTE, J. M. M.; FIGUEIREDO, E. L.; RODRIGUES, L.R.S. Utilização do azul de bromofenol conservado a 4° e 29°C como método de coloração vital para avaliação do espermatozóide ovino. **Revista Ciências Agrárias**, nº 46, p. 287 – 297, 2006.

MICERA, E.; ALBRIZIO, M.; SURDO, N.C.; ZARRILLI, A. A semi-immobilizing system associated with microspectrofluorimetric and videoimaging analysis for intracytoplasmic calcium measurement in individual viable spermatozoa. **Journal of Biotechnology**, v. 133, p. 90 – 95, 2008.

MIES FILHO, A. Tecnologia do sêmen II – Suínos. Em: **Inseminação Artificial**. v. 2, Sexta edição. Porto Alegre: Sulina, p. 483 – 485, 1987.

MORTIMER, S.T.; MORTIMER, D. Kinematics of human spermatozoa incubated under capacitating conditions. **Journal of Andrology**, v. 11, p. 195 – 203, 1990.

MORTIMER, S.T.; SWAN, M.A.; MORTIMER, D. Effect of seminal plasma on capacitation and hyperactivation in human spermatozoa. **Human Reproduction**, v. 13, p. 2139 – 2146, 1998.

MORTIMER, S.T. Casa- Practical aspects- **Journal of Andrology**, p.515-524, 2000.

NAKAMURA, M.; MORIYA, M.; BABA, T.; MICHIKAWA, Y.; YAMANOBE, 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.

NISHIDA, S.; YAMANO, S.; AONO, T. Exposure of human sperm to low-calcium medium enhances fertilizing ability. **Arch Andrology**, v. 36, p. 145 – 153, 1996.

NISHIMURA, K. Effect of calcium ions on the malate-aspartate shuttle in slow-cooled boar spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 49, p. 537 – 543, 1993.

PEÑA, F. J.; JOHANNISSON, A.; WALLGREN, M.; RODRIGUEZ, M. H. Antioxidant supplementation *in vitro* improves boar sperm motility and mitochondrial membrane potential after cryopreservation of different fractions of the ejaculate. **Animal Reproduction Science**, v. 260, p. 9699 – 9705, 2003.

PITCHER, J.A.; FREEDMAN, N.J.; LEFKOWITZ, R.J. G protein-coupled receptor kinases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 67, p. 653 – 692, 1998.

PRIEN, S.D.; LOX, C.D.; MESSER, R.H.; DELEON, F.D.; Seminal concentrations of total and ionized calcium from men with normal and decreased motility. **Fertility and Sterility**, v. 54, p. 171 – 172, 1990.

PUTNEY, J.W.Jr. A model for receptor-regulated calcium entry. **Cell Calcium**, v. 7, p. 1 – 12, 1986.

PUTNEY, J.W.Jr. Capacitative calcium entry revisited: Review article. **Cell Calcium**, v. 11, p. 611 – 624, 1990.

QUILL, T.A.; SUGDEN, S.A.; ROSSI, K.L.; DOOLITTE, L.K.; HAMMER, R.E.; GARBERS, D.L. Hyperactivated sperm motility driven by CatSper 2 is required for fertilization. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 100, p. 14869 – 14874, 2003.

REN, D.; NAVARRO, B.; PEREZ, G.; JACKSON, A.C.; HSU, S.; SHI, Q.; TILLY, J.L.; CLAPHAM, D.E. A sperm ion channel required for sperm motility and male fertility. **Nature**, v. 413, p. 603 – 609, 2001.

ROBERTSON, L.; WOLF, D.P.; TASH, J.S. Temporal changes in motility parameters related to acrosomal status: identification and characterization of populations of hyperactivated human sperm. **Biology of Reproduction**, v. 39, p. 797 – 805, 1988.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Methods for sperm evaluation and their relationship to fertility. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, Goiânia. Anais Palestras, 16, 2005.

SCHUH, K.; CARTWRIGHT, E.J.; JANKEVICS, E.; BUNDSCHU, K.; LIEBERMANN, J.; WILLIAMS, J.C.; ARMESILLA, A.L.; EMERSON, M.; OCEANDY, D.; KNONELOCH, K.P.; NEYSES, I. Plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase 4 is required for sperm motility and male fertility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 41246 – 41252, 2004.

SHALGI, R.; SMITH, T.T.; YANAGIMACHI, R.A.; A quantitative passage of capacitated and uncapacitated hamster spermatozoa through the uterotubal junction. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 419 – 424, 1992.

SIMPSON, A.M.; SWAN, M.A.; WHITE, I.G. Calcium uptake, respiration and ultrastructure of sperm exposed to ionophore A23187. **Archives of Andrology**, v. 19, p. 5 – 18, 1987.

STAUSS, C.R.; VOTTA, T.J.; SUAREZ, S.S. Sperm motility hyperactivation facilitates penetration of the hamster zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v. 52, p. 1280 – 1285, 1995.

SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OVERSTREET, J.W. Movement characteristics and acrosomal status of rabbit spermatozoa recovered at the site and time of fertilization. **Biology of Reproduction**, v. 29, p. 1277 – 1287, 1983.

SUAREZ, S.S.; KATZ, D.F.; OWEN, D.H.; ANDREW, J.B.; POWELL, R.L. Evidence for the function of hiperactivated motility in sperm. **Biology of Reproduction**, v. 44, p. 375 – 381, 1991.

SUAREZ, S.S.; DAI, X.B. Hyperactivation enhances mouse sperm capacity for penetrating viscoelastic media. **Biology of Reproduction**, v. 46, p. 686 – 691, 1992.

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.

SUAREZ, S.S.; DAI, X.B. Intracellular calcium reaches different levels of elevation in hyperactivated and acrosome-reacted hamster sperm. **Molecular Reproduction & Development**, v. 42, p. 325 – 333, 1995.

SUAREZ, S.S. Hyperactivated motility in sperm. **Journal of Andrology**, v. 17, p. 331 – 335, 1996.

TARDIF, A. L.; FARRELL, P. B.; TROUERN-TREND, V.; FOOTE, R. H. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. **Journal Dairy Science**, v. 80, p. 1606 – 1612, 1997.

TASH, J.S.; BRACHO, G.E. Regulation of sperm motility: Emerging evidence for a major role for protein phosphatases. **Journal of Andrology**, v. 15, p. 505 – 509, 1994.

TONIOLLI, R. **Estudo do poder fecundante dos espermatozóides do varrão: melhorias nas condições de conservação**. 1996. Tese (Doutorado) - Université François Rabelais de Tours, França, 1996.

TONIOLLI, R.; COMBARNOUS, Y. Adição de cálcio (CaCl<sub>2</sub>) ao diluidor do sêmen reprodutos: efeito sobre a motilidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, n.1, p. 33 -40, 1999.

TURNER, R.M. Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. **Reproduction Fertility and Development**, v. 18, p. 25 – 38, 2006.

VERSTENGEN, J.; IGUER-OUADA, M.; ONCLIN, K. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. **Theriogenology**, v. 57, p. 149 – 179, 2002.

VINES, C.A; YOSHIDA, K.; GRIFFIN, F.J.; PILLAI, M.C.; MORISAWA, M.; YANAGIMACHI, R.; CHERR, G.N. Motility initiation in herring sperm is regulated by reverse sodium-calcium exchange. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, p. 2036 – 2031, 2002.

WALENSKY, L.D.; SNYDER, S.H. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors selectively localized to the acrosomes of mammalian sperm. **The Journal of Cell Biology**, v. 130, p. 857 – 869, 1995.

WENNEMUTH, G.; BABCOCK, D.F.; HILLE, B. Calcium clearance mechanisms of mouse sperm. **The Journal of General Physiology**, v. 122, p. 115 – 128, 2003.

WHITE, D.R.; AITKEN, R.J. Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility. **Gamete Res**, v. 22, p. 163 – 177, 1989.

WIESNER, B.; WEINER, J.; MIDDENDORFF, R.; HAGEN, V.; KAUPP, U.B.; WEYAND, I. Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca<sup>2+</sup> entry into sperm. **The Journal of Cell Biology**, v. 142, p. 473 – 484, 2007.

WITHERS, S.; CARTWRIGHT, E.J.; NEYSES, L. Sperm phenotype of mice carrying a gene deletion for the plasma membrane calcium/calmodulin dependent ATPase 4. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, p. 93 – 97, 2006.

YANAGIMACHI, R. *Invitro* capacitation of hamster spermatozoa by follicular fluid. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 18, p. 275 – 286, 1969.

YANAGIMACHI, R. The movement of golden hamster spermatozoa before and after capacitation. **Journal of Reproduction & Fertility**, v. 23, p. 193 – 196, 1970.

YANAGIMACHI, R.; USUI, N. Calcium dependent of the acrosome reaction and activation of guinea pig spermatozoa. **Experimental Cell Research**, v. 89, p. 161 – 174, 1974.

YANAGIMACHI, R. Requirement of extracellular calcium ions for various stages of fertilization and fertilization-related phenomena in the hamster. **Gamete Res**, v. 5, p. 323 – 344, 1982.

YOSHIDA, M.; INABA, K.; ISHIDA, K.; MORISAWA, M. Calcium and cyclic AMP mediate sperm activation, but  $\text{Ca}^{2+}$  alone contributes sperm chemotaxis in the ascidian, *Ciona savignyi*. **Development Growth & Differentiation**, v. 36, p. 589 – 595, 1994.

YOSHIDA, M.; ISHIKAWA, M.; IZUMI, H.; DE SANTIS, R.; MORISAWA, M. Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, p. 149 – 154, 2003.

## 11. Anexos

### Anexo A. Composição do **diluidor BTS** - *Betsville Thawing Solution* para sêmen suíno

<b>Ingredientes</b>	<b>BTS</b>
Glicose (g)	37,00
Citrato de sódio (g)	6,00
Bicarbonato de sódio (g)	1,25
EDTA (g)	1,25
Cloreto de potássio (g)	0,75
Penicilina G potássica (UI)	500.000
Sulfato de estreptomicina (g)	0,50
Água destilada q.s.p. (mL)	1000

Fonte: Minitub do Brasil Ltda

### Anexo B. Composição do corante **Azul de Bromofenol** para avaliação do percentual de espermatozóides vivos.

0,1 g de azul de bromofenol

0,4 g de citrato de sódio

10 mL de água destilada

**OBS.:** Deverá ser medida a osmolaridade da solução e se necessário, ajustada com água destilada até ficar entre 300 e 310 mOsm.

### Anexo C. Fotos ilustrando a técnica da mão enluvada para coleta de sêmen suíno.

