



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

OTÁVIO DE JESUS SOUZA COSTA

**INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO DA INSULINA E DO FATOR DE
CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA DO TIPO I
(IGF-I) AO MEIO CRIOPROTETOR SEMINAL DE BOVINOS**

São Luís
2015

OTÁVIO DE JESUS SOUZA COSTA

**Influência da adição da Insulina e do fator de crescimento semelhante à
Insulina do tipo I (IGF-I) ao meio crioprotetor seminal de bovinos**

Dissertação apresentada à Escola de Medicina
Veterinária da Universidade Estadual do
Maranhão como requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciência Animal

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: Prof. Dr. Fernando Andrade Souza

São Luís
2015

Costa, Otávio de Jesus Souza, 1975-

Influência da adição da Insulina e do Fator de Crescimento semelhante à Insulina do Tipo I (IGF-I) ao meio crioprotetor seminal de bovinos / Otávio de Jesus Souza Costa. – São Luís, 2015.

61p. : il.

Orientador: Fernando Andrade Souza

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Maranhão, Curso de Medicina Veterinária

Inclui bibliografia

1. Bovinos (Nelore) – Reprodução – Dissertações. 2. Sêmen – Análise – Dissertações. 3. Insulina – Dissertações. 4. IGF-I – Dissertações. I. Souza, Fernando Andrade. II. Universidade Estadual do Maranhão. Escola de Medicina Veterinária. III. Título

CDU – 591.147:636.2

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome do autor: COSTA, Otávio de Jesus Souza

Título: **Influência da adição da Insulina e do fator de crescimento semelhante à Insulina do tipo I (IGF-I) ao meio crioprotetor seminal de bovinos**

Dissertação apresentada ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal

Defendida em 27 de março de 2015 e aprovada pela banca examinadora constituída por:

Prof. Dr. Fernando Andrade Souza
Orientador

Prof. Dr. Ricardo de Macedo Chaves
1º membro

Prof. Dr. Rafael Augusto Satrapa
2º membro

Comitê de Ética em Experimentação Animal

Senhor,

Em ti sempre confiei. Sempre me apoiei.

Deste-me coragem e força para superar
as adversidades.

Discernimento para definir o caminho.

A ti rogo e agradeço.

À meus pais, Ozéas da Silva Costa e Luciléa do Socorro Souza Costa, que são a efetiva presença de Deus na minha vida. Obrigado pelo esforço e pela dedicação na criação. Não foram em vão. Seus ensinamentos são e serão sempre marcantes na minha trajetória.

Ao amigo e orientador Prof. Dr. Fernando Andrade Souza, a quem devo todo o aprendizado na Reprodução Animal. Minha grande admiração pelo profissional ético, competente e de elevada capacidade. Seu apoio, ensinamento e cobrança foram essenciais. Agradeço a acolhida. Meu respeito, pelo grande ser humano que és.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beir-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante dos meus olhos”.

Isaac Newton

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

Madre Tereza de Calcutá

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Maranhão e ao Curso de Medicina Veterinária, pela criação e condução deste mestrado.

Ao colegiado do Curso de Mestrado em Ciência Animal, pela oportunidade de realização deste trabalho. Um agradecimento especial à secretária do curso, Sra. Francisca (a Fran), pelos vários momentos de orientação, conselho e auxílio nas atividades do curso.

Aos Srs. Renato Pontes e José Guilherme Pontes, proprietários do grupo Companhia Agropecuária do Arame, da qual faz parte a Fazenda Soberana, onde foi desenvolvido o projeto, e também ao Médico Veterinário da propriedade, Dr. Wendel. Obrigado pelo incondicional apoio.

À todos que fazem o LABRA (Laboratório de Reprodução Animal) da Universidade Estadual do Maranhão, professores, mestrandos e graduandos, que de uma forma ou de outra contribuíram para a consecussão deste projeto, em especial aos colegas mestrandos Diego Santos e Sâmara, pelos diversos momentos de auxílio.

Aos Médicos Veterinários Felipe, Yndira e Talita, pela acolhida e ensinamentos transmitidos nas análises realizadas nas Universidades Federal do Piauí e Estadual do Ceará.

À Banca examinadora, composta pelos titulares Prof. Dr. Ricardo de Macedo Chaves e Prof. Dr. Rafael Augusto Satrapa, e pelo suplente Prof. Dr. Abisai de Oliveira Sousa. Pela presença e pelos conselhos na correção deste trabalho.

Aos colegas do Banco do Nordeste do Brasil, em especial os colaboradores das Centrais de Crédito de Clientes de Médio Porte e de Varejo, pelo incentivo e compreensão nos momentos de ausência.

Aos amigos Diego de Assis Vieira, Márcio Hermens Santos Oliveira, Oseas da Costa Sousa, Gildomar Marinho, Zema Ribeiro e Graziela Ribeiro que por incontáveis vezes me escutaram, me orientaram e me incetivaram, dando novo folego para continuar nessa jornada.

À minha família, pais e irmãos, pelo apoio intrínseco, mesmo à distância.

À Ana Márcia da Silva, minha namorada, amiga de todas as horas. Pelo essencial suporte emocional.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	16

CAPÍTULO I: Revisão de Literatura

Ações da Insulina e do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do Tipo I (IGF-I) no plasma seminal e na funcionalidade da célula espermática.....	20
Resumo.....	20
Abstract.....	20
1. Introdução.....	21
2. Revisão de Literatura.....	22
2.1 Componentes do plasma seminal e os efeitos da congelação na célula espermática.....	22
2.2 Ações da Insulina.....	25
2.3 Ações do IGF-I.....	27
3. Considerações finais.....	29
4. Hipótese.....	30
5. Objetivo Geral.....	30
6. Objetivos Específicos.....	30
Referências Bibliográficas.....	31

CAPÍTULO II: Experimento

Análises do sêmen congelado após adição de Insulina e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do Tipo I (IGF-I).....	36
Resumo.....	36
Abstract.....	37
1. Introdução.....	38
2. Material e Métodos.....	40
2.1 Localização e dados climatológicos.....	40
2.2 Animais experimentais.....	41
2.3 Procedimento experimental.....	41
2.3.1 Preparo do diluidor.....	41
2.3.2 Materiais e procedimentos para coleta e congelamento do sêmen.....	41
2.3.3 Delineamento Experimental.....	42
2.3.4 Análises laboratoriais.....	43

2.3.4.1	Análise Morfológica.....	43
2.3.4.2	Teste de Termoresistência Rápida (TTRr).....	44
2.3.4.3	Azul de Tripan e Giemsa.....	44
2.3.4.4	Análise Computadorizada da Motilidade Espermática (Computer Assisted Semen Analysis – CASA).....	45
2.3.4.5	Análise por Sondas Fluorescentes.....	46
3.	Resultados	48
3.1	Exame Andrológico.....	48
3.2	Teste de Termoresistência Rápida (TTRr).....	49
3.3	Azul de Tripan e Giemsa.....	50
3.4	Análise Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA).....	52
3.5	Sondas Fluorescentes.....	53
4.	Discussão	55
5.	Conclusão	58
	Referências Bibliográficas	60
	Anexos	62
1.	Composição do diluidor TRIS/GEMA a 20%.....	62
2.	Relação dos materiais utilizados para coleta e congelamento do sêmen.....	62
3.	Detalhes da Câmara de Neubauer e a descrição da fórmula para cálculo da concentração espermática.....	63
4.	Sistema programável para criopreservação de sêmen TK-3000®.....	63
5.	Aparelho para análise pelo CASA.....	64
6.	Análise de integridade de membrana plasmática por sondas fluorescentes.....	64
7.	Análise de peça intermediária (função mitocondrial) por sondas fluorescentes, evidenciando espermatozoides íntegros.....	65
8.	Análise de peça intermediária (função mitocondrial) por sondas fluorescentes, evidenciando espermatozoides lesados.....	65
9.	Análise de integridade de membrana acrossomal por sondas fluorescentes, evidenciando espermatozoides íntegros.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Exame escrotal e análise subjetiva inicial do sêmen de seis touros Nelore a serem alocados em experimento com quatro tratamentos distintos.....	49
Tabela 2	Análise da morfologia espermática de seis touros Nelore a serem alocados em experimento com quatro tratamentos distintos (%)......	49
Tabale 3	Média \pm EPM dos resultados da motilidade espermática (%) avaliada pelo Teste de Termorresistência Rápida (TTRr, 45 °C por 30 min) do sêmen criopreservado de seis touros Nelore.....	50
Tabela 4	Média \pm EPM dos resultados do teste de Azul de Tripán e Giemsa efetuado no sêmen criopreservado de seis touros Nelore, avaliando-se quatro tratamentos distintos.....	51
Tabela 5	Média \pm EPM dos resultados da análise computadorizada do movimento espermático feito pelo sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) em sêmen criopreservado de seis touros Nelore, avaliando-se quatro tratamentos distintos.....	52
Tabela 6	Média \pm EPM dos resultados da análise computadorizada da motilidade espermática feito pelo sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) em sêmen criopreservado de seis touros Nelore, avaliando-se quatro tratamentos distintos.....	52
Tabela 7	Média \pm EPM dos resultados da análise computadorizada da velocidade espermática feito pelo sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) em sêmen criopreservado de seis touros Nelore, avaliando-se quatro tratamentos distintos.....	53
Tabela 8	Média \pm EPM dos resultados da análise por sondas fluorescentes para observação da integridade de membrana plasmática de espermatozoide criopreservado de seis touros Nelore, avaliando-se quatro tratamentos distintos.....	53
Tabela 9	Média \pm EPM dos resultados da análise por sondas fluorescentes para observação da integridade de peça intermediária de espermatozoide criopreservado de seis touros Nelore, avaliando-se quatro tratamentos distintos.....	54

Tabela 10	Média ± EPM dos resultados da análise por sondas fluorescentes para observação da integridade de membrana acrossomal de espermatozoide criopreservado de seis touros Nelore, avaliando-se quatro tratamentos distintos.....	54
-----------	---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem durante a análise pelo CASA, evidenciando as cores que o sistema atribui aos espermatozoides de acordo com a classificação do movimento.....	45
Figura 2	Expressão das células espermáticas após TBG. Letras distintas diferem pelo teste de Friedman ($P < 0,05$).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
%	Porcentagem
®	marca registrada
10 ⁶	unidade dos milhões
600G	força centrífuga relativa, em gravidade
>	maior que
<	menor que
+	Adição
±	mais ou menos
-	subtração ou hífen
X	Multiplicação
/	Divisão
()	Parênteses
'	Minutos
"	Segundos
B	Beta
μ	Micro
Cm	Centímetro
et al	e colaboradores
G	Gramma
H	Horas
Kg	Quilograma
L	Litro
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
Min	Minuto
Mm	Milímetro
mV	Milivolt
Ng	Nanograma
Nm	Nanômetro

P	nível de significância
q.s.p.	quantidade suficiente para
UI	unidades internacionais
A	grandeza que traduz o número de sptz contados na Câmara de Neubauer
AMPc	monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	análise de variância
Asbia	Associação Brasileira de Inseminação Artificial
ATP	Adenosinatrifosfato
B	fator de diluição utilizado na Câmara de Neubauer
BioEstat [®]	programa estatístico
CASA	Computer-Assisted Semen Analysis – Análise Computadorizada do Sêmen
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CD	cauda dobrada
CE	sigla do Estado do Ceará
CETEA	Comitê de Ética e Experimentação Animal
CFDA	diacetato de carboxifluoresceína
DNA	ácido desoxirribonucléico
EPM	erro padrão médio
FITC	isocianato de fluoresceína
G -1,-2,-3,-4	grupos/tratamentos testados
G6PDH	glicose-6-fostato desidrogenase
GCD	gota distal
GCP	gota proximal
GH	hormônio do crescimento
HTM-IVOS	Hamilton-Thorne Bioscience – aparelho utilizado na análise pelo CASA
IA	inseminação artificial
IGF -I –II	fator de crescimento semelhante à insulina dos tipos I e II
IGFBP	proteína ligadora de fator de crescimento semelhante à insulina
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IP	iodeto de propídio
JC-I	iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbocianina
LABRA	Laboratório de Reprodução Animal

LH	hormônio luteinizante
LIN	Linearidade
MA	sigla do Estado do Maranhão
N	grandeza que traduz o número de quadrados grandes contados na Câmara de Neubauer menos a superfície contada
N	grandeza que indica o número de sptz por mm ³ contados na Câmara de Neubauer
NADPH	fostato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
NIB	Núcleo Integrado de Biotecnologia
P1S2	curva de congelamento calibrada para bovino (P) e para sêmen (S) numa queda positiva de 0,5° C/min
P.A.	puro para análise
PBS	fosfato buffer salino
PI	sigla do Estado do Piauí
PKA	proteína quinase A
PNA	lecitina Arachis hypogaea
PPP	via da pentose fosfato
RNA	ácido ribonucléico
ROS	espécies reativas de oxigênio
Rpm	rotações por minuto
Sptz	Espermatozoide
STR	Retilinearidade
T0,T1,T2,T3	tempos avaliados nas análises
TBG	azul de tripan e giemsa
TK-3000 [®]	máquina de congelamento
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol
TRIS-GEMA	diluidor de sêmen composto por TRIS, frutose, glicerol, penicilina, água destilada e gema de ovo.
TTRr	teste de termorresistência rápida
UCD	meio de montagem utilizado na solução de trabalho para preparação da sonda fluorescente FITC-PNA
UECE	Universidade Estadual do Ceará

UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
UFPI	Universidade Federal do Piauí
VAP	velocidade média da trajetória
VCL	velocidade curvilínea
VSL	velocidade linear progressiva

CAPÍTULO I

Revisão de Literatura

Ações da Insulina e do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do Tipo I (IGF-I) no plasma seminal e na funcionalidade da célula espermática

Resumo

O plasma seminal é composto por diversas substâncias que expressam o papel essencial desse fluido orgânico na manutenção das funções espermáticas no animal *in vivo*. Dentre essas substâncias destacam-se alguns hormônios como a Insulina e o Fator de Crescimento semelhante à Insulina do Tipo I (IGF-I), por apresentarem ação primordial na estrutura e motilidade espermática, favorecendo a fecundação. Fatores endócrinos e/ou locais estão associados à expressividade e/ou função desses hormônios, auxiliando para uma melhor condição espermática. Como são cruciais as ações desses hormônios no animal *in vivo*, podem também servir de parâmetro da preservação espermática frente ao estresse causado na utilização de processos criogênicos nas atividades da biotecnologia da reprodução animal.

Palavras-chave: bovinos, metabolismo espermático, criopreservação, ação hormonal

Abstract

The seminal plasma is composed of various substances that express the essential role of this body fluid in the maintenance of sperm functions in animals *in vivo*. Among these substances stand out some hormones such as insulin and growth factor similar to insulin type I (IGF-I) due to primary action in the structure and motility, favoring fertilization. Endocrine factors and / or sites are associated with the expression and / or function of these hormones, helping to better sperm condition. How crucial are the actions of these hormones in animals *in vivo*, can also serve as a parameter of sperm preservation against the stress caused in the use of cryogenic processes in the activities of biotechnology of animal reproduction.

Keywords: cattle, sperm metabolism, cryopreservation , hormone action

1. Introdução

Segundo relatório de 2013 da Associação Brasileira de Inseminação Artificial (Asbia), o mercado dessa tecnologia reprodutiva tem apresentado uma demanda crescente. Naquele ano foram comercializadas aproximadamente 14,3 milhões de doses, o que significou um aumento de 5,5% em comparação com o ano anterior. Mas, apesar desse progresso, perdas em torno de 50% de espermatozoides viáveis ainda são obtidas durante o processo de criopreservação do sêmen (Watson, 2000) por danos ultra-estruturais, físicos, bioquímicos ou funcionais nos diferentes componentes da célula espermática (Celeghini, 2005). Para tanto, diversas pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de melhorar esse índice de viabilidade espermática na pós-congelação.

No animal *in vivo* são identificadas diversas substâncias no plasma seminal que atuam na proteção dos espermatozoides durante seu trânsito pelo epidídimo após a ejaculação até a fecundação no trato reprodutivo da fêmea (Moura *et al.*, 2011) com destaque para proteínas e hormônios. As proteínas são os constituintes orgânicos encontrados em maior quantidade, enquanto que os hormônios apresentam importantes ações ligadas à fisiologia das células espermáticas (Jelínková *et al.*, 2003). Dentre os hormônios presentes no plasma seminal, a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) merecem evidência, por apresentarem papel fundamental na estrutura e motilidade espermática, favorecendo a fecundação (Ahima *et al.*, 2000; Tena-Sempere e Barreiro, 2002).

O papel da insulina no controle da glicemia (manutenção da homeostase da glicose) é bem conhecido. Por esse mecanismo, ela garante o fornecimento de energia para o metabolismo celular. Mas, além dessa, também outras atividades específicas no organismo, em especial no sistema reprodutivo, são reconhecidas, como a promoção da diferenciação celular durante a espermatogênese (Nakayama *et al.*, 1999), a atuação na aquisição da capacidade fecundante e na motilidade espermática (Andò e Aquila, 2005; Aquila *et al.*, 2005) ou a participação como fator de preservação do estado não capacitado do espermatozoide (van Tilburg *et al.*, 2008).

Já o IGF-I regula as funções das gônadas e da glândula hipofisária, sendo essencial para o desenvolvimento sexual e da fertilidade em mamíferos. Uma ação autócrina do IGF-I sobre as células de Sertoli contribui, significativamente, para a homeostase morfofisiológica dessas células (Froment *et al.*, 2007). Para Gnessi *et al.* (1997), as funções do IGF-I nos testículos parecem ser servidas por uma produção local, sem contribuição endócrina,

apresentando papel determinante no desenvolvimento e diferenciação das células de Leydig e de Sertoli, e atuando tanto na preservação da membrana plasmática da célula espermática como na sua motilidade. Por isso, a ausência do IGF-I nos testículos pode induzir infertilidade.

Frente a essas observações, pondera-se que a presença desses hormônios pode ser crucial na preservação espermática quando se utiliza processos criogênicos. Assim, objetivou-se com essa revisão de literatura, ressaltar os principais pontos envolvidos nos eventos funcionais da célula espermática associados à presença de hormônios como a Insulina e o IGF-I no plasma seminal.

2. Revisão de Literatura

2.1 Componentes do plasma seminal e os efeitos da congelação na célula espermática

Os primeiros estudos que trataram sobre a composição do plasma seminal bovino surgiram na década de 1950. Apesar das limitações tecnológicas da época, estes estudos abriram caminho para a investigação mais detalhada da constituição do fluido seminal (Filho, 2010).

O plasma seminal tem um papel essencial para as funções espermáticas *in vivo* (Kraus *et al.*, 2005). As substâncias que o compõem, que têm função importante na proteção dos espermatozoides durante seu trajeto desde a ejaculação até a fecundação no trato reprodutivo da fêmea (Moura *et al.*, 2011), são oriundas do fluido epididimário e das secreções das glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino (Souza *et al.*, 2010). A grande complexidade de substâncias do plasma seminal é decorrente da quantidade dessas glândulas presentes, que auxiliam indiretamente na eficiência da fecundação (Vasconcelos, 2009).

Essas substâncias no plasma seminal compensam a pouca existência de citoplasma no espermatozoide, resultado da divisão celular ocorrida na espermatogênese que elimina algumas funções normalmente encontradas no citoplasma das células diplóides. Essa perda é compensada com as diversas secreções que o fluido seminal obtém no seu trajeto e que contribuem com fatores necessários para a função e preservação espermática no meio extracelular (Filho, 2010). Bellin *et al.* (1998) mostraram a importância dessas substâncias do plasma seminal sobre a qualidade da célula espermática, ressaltando que alguns desses elementos possam servir como marcadores para a fertilidade por evidenciar a qualidade do fluxo seminal.

As proteínas são os constituintes orgânicos encontrados em maior quantidade. Muitas delas têm influência na congelabilidade do sêmen, o que permite classificar os indivíduos em produtores de sêmen de alta e baixa congelabilidade (Jobim *et al.*, 2009). Mas além das proteínas, esse meio também apresenta sais minerais e hormônios que atuam juntamente a elas, tendo importantes funções fisiológicas sobre as células espermáticas (Jelínková *et al.*, 2003). Entre os hormônios, a insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) se destacam, por apresentarem papel primordial na estrutura e motilidade espermática, favorecendo a fecundação (Ahima *et al.*, 2000; Tena-Sempere e Barreiro, 2002).

A criopreservação, técnica já bastante disseminada e necessária para a biotecnologia reprodutiva, tem como princípio básico a redução da temperatura como forma de reduzir o metabolismo celular, permitindo que as células ou os tecidos sejam conservados por períodos indeterminados, permitindo a retomada do desenvolvimento celular normal após o armazenamento em nitrogênio líquido (Castro *et al.*, 2011). Contudo, essa técnica provoca danos à célula espermática, levando a perdas em torno de 50% das células viáveis após o processo. Por isso, diversos estudos têm sido conduzidos no intuito de encontrar métodos que minimizem os efeitos indesejáveis da congelação e descongelação.

Segundo Medeiros *et al.* (2002), espermatozoides submetidos à criopreservação são expostos a condições combinadas de diluição do plasma seminal, baixa temperatura e ambiente hipertônico. Estas condições levam à perda e reorganização de componentes da membrana plasmática semelhantes ao que é observado na capacitação. Estas alterações na membrana, quando não matam o espermatozoide, resultam numa diminuição da sua vida útil e da capacidade de interagir com o ambiente do trato reprodutivo feminino.

Não resta dúvida de que a modificação ou mesmo a perda de proteínas do plasma seminal e da superfície espermática parecem fazer parte do mecanismo da crioinjúria que levam à menor fertilidade do sêmen congelado (Jobim *et al.*, 2009). A lesão celular durante o processo de criopreservação pode ser causada diretamente através de rupturas de estruturas celulares (membranas), ou indiretamente, alterando os processos metabólicos das células espermáticas (Holt, 2000). A mudança na temperatura ocasiona uma sequência de eventos que se somam na causa da lesão celular como a formação de cristais de gelo e o estresse osmótico, as alterações na membrana do espermatozoide, até lesões no DNA da célula. Em consequência, há diminuição do número de células viáveis assim como da capacidade funcional espermática (Watson, 2000).

Além das mudanças físicas pelas quais passa a membrana durante o resfriamento, a regulação do influxo de cálcio também é afetada por ele, com graves consequências em termos de função celular, podendo até ser incompatível com a viabilidade do espermatozoide. O influxo de cálcio durante o resfriamento contribui tanto para o início da capacitação quanto para o início da fusão das membranas plasmática e acrossomal externa (Leite *et al.*, 2011).

A utilização de crioprotetores pode minimizar significativamente esses danos (Hu *et al.*, 2011). De modo geral, essas substâncias têm a função de proteger a célula da formação de cristais de gelo e auxiliar nas mudanças da composição do meio intracelular, assim como reduzir os efeitos causados pelas mudanças de temperatura (Watson, 2000).

Outro fator que também pode afetar a célula espermática é a velocidade de congelação. Januskauskas *et al.* (1999), em trabalho relacionando as taxas de resfriamento sobre a motilidade espermática e a integridade de membrana, relataram que o resfriamento lento pode ser menos favorável do que o rápido para a sobrevivência espermática, uma vez que se observou que o resfriamento lento causou uma redução do número de espermatozoides móveis e promoveu agilidade aos espermatozoides, o que pode afetar negativamente a longevidade.

E, segundo Holt (2000), da mesma forma que a congelação, a descongelação do sêmen também pode ter influência na qualidade espermática. As temperaturas e velocidade de descongelação dependem diretamente da curva de congelação. Ou seja, uma melhor sobrevivência celular pode ser obtida se observar uma taxa de descongelação relacionada com a de congelação que foi escolhida.

Em suma, é através da interação entre diluidor, crioprotetor, curvas de resfriamento e congelamento, e descongelamento que se consegue minimizar os danos causados pelo processo de criopreservação, preservando as estruturas espermáticas após o congelamento (Leite, 2008; Celeghini, 2005).

A proteção das membranas do espermatozoide (plasmática, mitocondrial e acrossomais, interna e externa) é o ponto crucial a se observar no processo de congelação do sêmen. A membrana plasmática exerce papel fundamental na sobrevivência do espermatozoide no trato reprodutivo feminino e na manutenção de sua capacidade fecundante, visto que garante à homeostase celular, sendo essencial para manter a viabilidade. As mitocôndrias, localizadas na peça intermediária do espermatozoide, são responsáveis pela produção de ATP, que serve como fonte de energia para o batimento flagelar. E o acrossomo é indispensável para a fecundação. As modificações ocorridas nessas membranas durante a criopreservação causam, como

consequência, prejuízos na motilidade espermática, na produção de ATP e diminuição da capacidade fecundante ou até a morte celular (Celeghini, 2005).

2.2 Ações da Insulina

A insulina é um hormônio anabólico, produzido nas células β do pâncreas, que promove a captação de glicose e aminoácidos, a síntese de proteínas e lipídeos e o aumento das funções intracelulares e da membrana plasmática. É importante para a promoção e regulação do crescimento, além da diferenciação e metabolismo celular (Souza *et al.*, 2010).

É amplamente reconhecida por seu papel no controle da glicemia, mantendo a homeostase da glicose, atuando em diferentes alvos, como fígado, músculos e tecido adiposo (Escott, 2012). Por ser um carboidrato complexo, a glicose não passa tão prontamente pelas membranas celulares, necessitando da presença de insulina para sua movimentação pra dentro da célula.

Além disso, a insulina exerce papel central na formação e regulação da função dos testículos, sendo seus receptores indispensáveis para o surgimento das gônadas (Nef *et al.*, 2003). Segundo Nakayama *et al.* (1999), a insulina promove a diferenciação das espermatogônias em espermátócitos primários pela ligação com os receptores de IGF-I presentes nestas células.

Juntamente com as ações a nível de membrana plasmática, a insulina também age no metabolismo do espermatozoide. A energia utilizada pela célula espermática para iniciar os processos catabólicos e manter a motilidade, o balanço iônico e as várias funções celulares vem por intermédio da glicólise. Aproximadamente, 90% dos ATPs utilizados como fonte energética em espermatozoides maduros são produzidos por esta via (van Tilburg *et al.*, 2008).

Em 1999, Urner e Sakkas relataram a existência de um evento regulado pela enzima NADPH (Fosfato de Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina) e que influenciava a capacidade do espermatozoide se fundir com o oócito. Em 2005, Andò e Aquila demonstraram que a insulina liberada pelo espermatozoide no ejaculado autorregulava a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), enzima limitante da via da pentose fosfato (PPP), uma reação oxidativa que tinha como um de seus resultados a produção do NADPH. Assim, por essa via, eles mostraram a participação crucial da insulina na aquisição da capacidade fecundante e na motilidade espermática, assim como na mediação da fusão dos gametas.

As ações da insulina demonstradas por meio de análise imunocitoquímica registraram um padrão de expressão heterogêneo deste hormônio, resultando em diferentes graus de condição energética entre os espermatozoides. Em amostras não capacitadas, na maioria das células espermáticas a insulina foi localizada no nível subacrossomal, na peça intermediária e ao longo de toda a cauda. Mas em espermatozoides capacitados, observou-se uma diminuição global e distribuição uniforme da intensidade do sinal de insulina sugerindo um possível envolvimento da mesma na indução da capacitação (Andò e Aquila, 2005).

Frente a essas observações, van Tilburg *et al.* (2008) determinaram que a baixa concentração de insulina em meios diluidores para congelamento de sêmen é associada ao maior número de células espermáticas capacitadas, o que sugere que durante o processamento do sêmen, quando o mesmo é diluído, a concentração de insulina presente no plasma seminal também é diluída, podendo ativar mecanismos que acarretem na capacitação precoce. Desta forma, estes autores colocam a insulina como fator de preservação do estado não capacitado, importante para a viabilidade desta célula no trato reprodutivo da fêmea até sua fusão com o oócito.

Ainda segundo van Tilburg *et al.* (2008), uma outra hipótese para justificar a ação da insulina em preservar a integridade acrossômica seria por meio do mecanismo que ocorre em alguns tipos celulares, como nas células hepáticas, em que a insulina inibe a ligação do AMPc à proteína quinase A (PKA), impedindo, conseqüentemente, a ativação desta enzima. As PKA's catalizam reações químicas gerando estímulos extra e intracelulares que podem, no caso da célula espermática, estimular a capacitação. Assim, a especificidade da insulina em antagonizar a ligação da PKA com o AMPc pode reduzir a atividade capacitante da célula espermática.

Apesar disso, estudos que mostram a capacidade autônoma do espermatozoide de liberar insulina (observada no ejaculado) sugerem que, por meio de um circuito de alça curta autócrina, a célula pode fornecer seu recrutamento de substratos energéticos, de acordo com as suas necessidades metabólicas. Isso ocorre independentemente da regulação sistêmica e pode representar um mecanismo de proteção que preserva a capacidade de fecundação da célula espermática por eventuais efeitos nocivos externos como a longa restrição calórica ou as alterações que ocorrem na homeostase energética a nível sistêmico (Aquila *et al.*, 2005 e Andò e Aquila, 2005).

A insulina também interfere na condição estrutural da célula espermática. Baccetti *et al.* (2002) relataram a observação de vários defeitos estruturais no sêmen de pacientes diabéticos,

através de exame realizado por microscopia eletrônica, indicando que a insuficiência reprodutiva nesses pacientes seria resultado da ação da doença sobre o eixo hipotálamo-hipofisário-testicular em vários níveis. Defeitos relacionados à imaturidade e apoptose espermática foram particularmente reconhecidos, destacando-se as alterações no acrossoma, no núcleo, na mitocôndria e na membrana plasmática. Estes resultados indicam um papel, pelo menos em parte, da insulina e do metabolismo de carboidratos, na espermatogênese.

Assim, frente a essas observações, pondera-se que a insulina, por estimular a síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídeos, e por aumentar as funções intracelulares e da membrana plasmática, pode ser responsável pela melhora da sobrevivência espermática (Abdelmonein *et al.*, 1998).

2.3 Ações do IGF-I

Os fatores de crescimento são polipeptídeos que funcionam como reguladores das células em crescimento e em diferenciação (Jones e Clemmons, 1995). São sintetizados principalmente pelo fígado, mas também são produzidos localmente pela maioria dos tecidos, onde atuam de forma autócrina e parácrina (Roith, 1997).

Especificamente, segundo Jones e Clemmons (1995), os fatores de crescimento semelhante à insulina dos tipos I e II (IGF I e II, do inglês “*Insulin like Growth Factor*”) são hormônios presentes em todo o organismo e que exercem potente ação mitogênica, metabólica e de diferenciação sobre as células do corpo, sendo frequentemente liberados em resposta à secreção pulsátil do hormônio do crescimento (GH).

Esses IGF's sistêmicos, no entanto, não apresentam uma ação direta sobre os eventos reprodutivos, mas influenciam indiretamente (através de seu papel na regulação nutricional) a adequação do animal ao evento reprodutivo em questão. É assim, por uma ação endócrina sistêmica relacionada à nutrição, que o IGF-I tem sido associado com várias características reprodutivas, como a idade ao primeiro parto, a taxa de concepção ao primeiro serviço e ao desenvolvimento embrionário pré-implantação (Velasquez *et al.*, 2008).

Contudo, a biossíntese dos IGF's não é exclusivamente sistêmica e regulada pela estimulação do GH. Ambos, IGF-I e -II, têm muitas ações que são independentes deste hormônio (MacPherson *et al.*, 2002).

Segundo Gnessi *et al.* (1997), no ambiente testicular, os IGF-I e -II compõem uma rede requintada de reguladores onde também se destacam seus receptores e as suas proteínas ligadoras, as IGFBPs. As interações nessa rede (comunicações inter, intra e celular ambiental) favorecem a melhor ação desses hormônios, permitindo-os participar primeiro no desenvolvimento da gônada e mais tarde na iniciação e manutenção da função testicular, respondendo, em parte, pela qualidade seminal.

O IGF-I pode atuar como regulador do crescimento em diversos tecidos de forma autócrina ou parácrina (Froment *et al.*, 2007). Nos testículos, suas funções assumem um papel determinante no desenvolvimento e diferenciação das células testiculares (de Leydig e de Sertoli), assim como na preservação tanto da membrana plasmática da célula espermática como da sua motilidade (Gnessi *et al.*, 1997). Estimulam a esteroidogênese por aumentar a densidade de receptores para gonadotropinas e a expressão de enzimas chave para esta via metabólica, sendo, conseqüentemente, implicados como importantes fatores na espermatogênese (Spiteri-Greech e Nieschlag, 1993). Por isso, a falta dessa substância nos testículos pode induzir infertilidade.

O IGF-I circulante também autorregula a produção de testosterona, agindo sobre os receptores de LH. Da mesma forma, num mecanismo de retroalimentação, a testosterona autorregula os receptores de IGF-I e a produção deste hormônio pelas células de Leydig (Wang e Hardy, 2004).

Brito *et al.* (2007) relataram uma forte associação do IGF-I circulante com o tamanho testicular sugerindo que este fator de crescimento pode ter efeito mitogênico direto sobre os testículos, podendo regular não somente a esteroidogênese testicular, mas também a proliferação celular em determinada fase da vida do animal.

Henricks *et al.* (1998) avaliaram a presença de IGF no plasma seminal de bovinos e determinaram a expressão de receptores de IGF-I nos espermatozoides ejaculados e sua ação sobre a motilidade espermática. Estes autores demonstraram que o IGF-I pode interagir diretamente com o seu receptor presente no espermatozoide, levando ao aumento da motilidade e da velocidade linear da célula espermática, sugerindo que o IGF-I possua papel regulatório nos eventos da pré-fecundação. Em adição, Colombo (1999), constatou diferença significativa na concentração de IGF-I total no plasma seminal humano entre grupos de homens férteis e imunoinférteis.

Ainda no plasma seminal, o IGF-I apresenta função regulatória no pós-ejaculado afetando a capacitação espermática por meio de uma série de mudanças fisiológicas, como mudança de íons intracelular, na fluidez da membrana plasmática e no metabolismo da célula espermática (Sánchez-Luengo *et al.*, 2005), mas esse papel é limitado pelas suas proteínas ligadoras, as IGFBPs, que regulam sua disponibilidade no plasma seminal.

A presença do IGF-I no sêmen assim como de seus receptores sobre os espermatozoides e a sua habilidade em estimular a motilidade espermática provê evidências de que o sistema IGF está envolvido também na fecundação (Henricks *et al.*, 1998). Uma vez que o receptor de IGF possui atividade tirosina quinase e seu ligante está presente no plasma seminal, o sistema IGF-I pode estar envolvido no sinal de transdução, conduzindo ao aumento da motilidade, a capacitação espermática e exocitose acrossômica (Gupta, 2005).

A associação da concentração plasmática de IGF-I no sêmen com a motilidade e a morfologia dos espermatozoides, sugere que o IGF-I possa desempenhar um papel crucial na função espermática (Macpherson *et al.*, 2002).

3. Considerações Finais

São recentes os estudos envolvendo as contribuições da Insulina e do IGF-I nas manutenções da funcionalidade e da integridade das células espermáticas. As funções já conhecidas desses hormônios a nível sistêmico no organismo se somam às novas descobertas de suas ações específicas no sistema reprodutivo. Em nível local, nos testículos, esses hormônios fazem parte de uma complexa rede fisiológica, com mecanismos de retroalimentação que têm impacto crucial na melhora na viabilidade dos espermatozoides. Considerando-se o alto índice de perda da viabilidade espermática provocado pelo processo de criopreservação, a adição desses hormônios nos meios diluidores para congelação pode oferecer uma melhora na condição metabólica e estrutural da célula espermática após o processo criogênico.

4. Hipótese

A adição da Insulina e do IGF-I ao meio diluidor para congelação de sêmen melhora a condição metabólica e estrutural das células espermáticas após a criopreservação.

5. Objetivo Geral

Avaliar a influência da Insulina e do IGF-I sobre a condição metabólica e estrutural das células espermáticas bovinas após a congelação.

6. Objetivos Específicos

- 1- Avaliar a membrana plasmática e acrossomal após a criopreservação;
- 2- Avaliar a condição metabólica da célula espermática;
- 3- Verificar se concentrações elevadas de insulina no meio diluidor são lesivas às células espermáticas;
- 4- Determinar se o acréscimo de insulina e/ou IGF-I no meio extensor de congelação aumenta a taxa de células espermáticas não capacitadas após o descongelamento;
- 5- Verificar se concentrações elevadas de IGF-I no meio diluidor favorece a motilidade da célula espermática após a criopreservação.

Referências Bibliográficas

ABDELMONEIN, I. Y.; BETH, R.; SABA, K.; et al. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.19, n.2, p.207-21, 1998.

AHIMA, R. S.; SAPER, C. B.; FLIER, J. S.; et al. Leptin regulation of neuroendocrine systems. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.21, n.3, p.263-307, 2000.

ANDÒ, S.; AQUILA, S. Arguments raised by the recent discovery that insulin and leptin are expressed in and secreted by human ejaculated spermatozoa. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.245, n.1-2, p.1-6, 2005.

AQUILA S.; GENTILE M.; MIDDEA E.; et al. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. **Endocrinology**, v.146, n.2, p.552-557, 2005.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL – ASBIA. **Relatório estatístico de importação, exportação e comercialização de sêmen**. 2013, 21p. Disponível em: <http://www.asbia.org.br/novo/upload/mercado/index2013.pdf>. Acesso em: 10/10/2014

BACCETTI, B.; LA MARCA, A.; PIOMBONI, P.; et al. Insulin-dependent diabetes in men is associated with hypothalamo-pituitary derangement and with impairment in semen quality. **Human Reproduction**, v.17, n.10, p.2673–2677, 2002.

BELLIN, M.E.; OYARZO, J.N.; HAWKINS, H.E.; et al. Fertility associated antigen on bull sperm indicates fertility potential. **Journal of Animal Science**, v.76, n.8, p.2032-2039, 1998.

BRITO, L. F. C.; BARTH, A. D.; RAWLINGS, N. C.; et al. Effect of nutrition during calthood and peripubertal period on serum metabolic hormones, gonadotropins and testosterone concentrations, and on sexual development in bulls. **Domestic Animal Endocrinology**, v.33, n.1, p.1-18, 2007.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G.; et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2, p.1-17, 2011.

CELEGHINI, E. C. C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005. 186f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

COLOMBO, J.B.; NAZ, R.K. Modulation of insulin-like growth factor-1 in the seminal plasma of infertile men. **Journal of Andrology**, Schaumburg, v.20, n.1, p.118 –125, 1999.

ESCOTT, G. M. **Ações da Insulina e do IGF-I sobre marcadores de ação hormonal em células de Sertoli de ratos em diferentes estágios de desenvolvimento**, 2012. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Fisiologia) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FILHO, I. C. B. **Clonagem, expressão e purificação de proteínas do plasma seminal bovino relacionadas à alta congelabilidade do sêmen**. 2010. 125f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

FROMENT, P., VIGIER, M., NÈGRE, D., et al. Inactivation of the IGF-I receptor gene in primary Sertoli cells highlights the autocrine effects of IGF-I. **Journal of Endocrinology**, v.194, n.3, p.557-68, 2007.

GNESSI, L.; FABBRI, A.; SPERA, G. Gonadal Peptides as Mediators of Development and Functional Control of the Testis: An Integrated System with Hormones and Local Environment. **Endocrine Reviews**, Connecticut, v.18, n.4, p.541-609, 1997.

GUPTA, G.S. Proteomics of Spermatogenesis. In: Chapter 3, **Non-Steroidal Signal Molecules In Spermatogenesis**, p.47-76, 2005.

HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R. et al. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: Influence on Sperm Motility. **Biology of Reproduction**, Bristol, v.59, n.2, p.330–337, 1998.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

HU, J.-H.; JIANG, Z.-L.; LV, R.-K.; et al. The advantages of low-density lipoproteins in the cryopreservation of bull semen. **Cryobiology**, v.62, p.83-87, 2011.

JANUSKAUSKAS, A.; GIL, J.; SÖDERQUIST, L.; et al. Effect of cooling rates on postthaw sperm motility, membrane integrity, capacitation status and fertility of dairy bull semen used for artificial insemination in Sweden. **Theriogenology**, v.52, p.641-58, 1999.

JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M. et al. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.32, p.99-107, 2003.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. **Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino**. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, n.6, p.25-31, dez. 2009. Disponível em www.cbpa.org.br. Acesso em 10/07/2014.

JONES, J. I.; CLEMMONS, D. R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. **Endocrinology Reviews**, Connecticut, v.16, n.1, p.3-34, 1995.

KRAUS, M.; TICHÁ, M.; ZELEZNÁ, B. et al. Characterization of human seminal plasma proteins homologous to boar AQN spermadhesins. **Journal of Reproductive Immunology**, v.65, n.1, p.33-46, 2005.

ROITH, D. L. Insulin-like growth factors. **Seminars in Medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center**. v.336, n.9, p.633- 639, 1997.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R., et al. Criopreservação do sêmen bovino. **Cient Ciênc Biol Saúde**, v.13, n.4, p.279-286, 2011.

LEITE, T. G. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros gir leiteiro**. 2008. 122f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MACPHERSON, M.L.; SIMMEN, R.C.M; SIMMEN, F.A.; et al. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 in equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, v.67, n.2, p.648-654, 2002.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.D.; et al. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better?. **Theriogenology**, v.57, p.327-344, 2002.

MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; et al. **Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade**. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, abr./jun. 2011. Disponível em www.cbra.org.br. Acesso em 15/09/2014.

NAKAYAMA Y., YAMAMOTO T., ABE S.I. IGF-I, IGF-II e insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of new testes. **International Journal Developmental Biology**, v.43, n.4, p.343-347, 1999.

NEF, S.; VERMA-KURVARI, S.; MERENMIES, J.; et al. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. **Nature**, v.426, p.291-295, 2003.

SÁNCHEZ-LUENGO, S.; FERÁNDEZ, P.J.; ROMEU, A. Insulin growth factors may be implicated in human sperm capacitation. **Fertility and Sterility**, v.83, n.4, 2005.

SOUZA, F. A.; MARTINS, J. A. M.; OSORIO, J. P.; et al. IGF-I, leptina, insulina e proteínas associadas à qualidade do plasma seminal: ação local. **Revista de Medicina Veterinária**, n.20. jul./dez. 2010.

SOUZA, F. A. **Perfil eletroforético de proteínas e concentrações de leptina, insulina e IGF-I do plasma seminal de tourinhos Gir-leiteiros na peripuberdade**. 2011. 115f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SPITERI-GRECH, J.; NIESCHLAG, E. Paracrine factors relevant to the regulation of spermatogenesis – a review. **Journal Reproduction and Fertility**, v.98, n.1, p.1-14, 1993.

TENA-SEMPERE M.; BARREIRO M. L. Leptin in male reproduction: the testis paradigm. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.188, n.1-2, p.9-13, 2002.

URNER, F.; SAKKAS, D. A possible role for the pentose phosphate pathway of spermatozoa in gamete fusion in the mouse. **Biology of Reproduction**, v.60, n.3, p.733–739, 1999.

VAN TILBURG, M. F.; SILVA, J. F. S.; DIAS, A. J. B.; et. al. Influência da insulina no congelamento e resfriamento do sêmen de ovino. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.3, p.731-739, 2008.

VASCONCELOS, A. B. **Bioquímica do sêmen**. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte n. 6, p. 32-35, dez. 2009. Disponível em www.cbra.org.br. Acesso em 20/10/2014.

VELAZQUEZ, M.A., SPICER, L.J., WATHES, D.C. The role of endocrine insulin-like growth factor-I (IGF-I) in female bovine reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**, n.35, p.325-342, 2008.

WANG, G.; HARDY, M.P. Development of Leydig cells in the insulin-like growth factor-I (IGF-I) knockout mouse: effects of IGF-I replacement and gonadotropic stimulation. **Biology of Reproduction**, Bristol, v. 70, n. 3, p. 632-639, 2004.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v.60-61, p.481-492, 2000.

CAPÍTULO II

Experimento

Análises do sêmen congelado após adição de Insulina e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do Tipo I (IGF-I)

Resumo

Objetivou-se com esse estudo avaliar a condição metabólica e estrutural das células espermáticas bovinas após a congelação acrescentando-se IGF-I e Insulina ao meio diluidor do sêmen. Foram utilizados 6 touros da raça Nelore, selecionados aleatoriamente dentre os reprodutores da rotina de uma fazenda localizada no município de Grajaú/MA. O ejaculado de cada touro foi submetido a quatro tratamentos: G1 – Controle; G2 – com Insulina (100 μ UI/mL); G3 – com IGF-I (150ng/mL); e G4 – com Insulina (50 μ UI/mL) + IGF-I (75ng/mL). Foi realizada análise subjetiva da motilidade, turbilhonamento e vigor espermático logo após a coleta do sêmen e após congelamento foram realizadas análises morfológicas e funcionais (Teste de Termoresistência Rápida - TTRr e de coloração pelo Azul de Tripán e Giemsa), análise computadorizada da motilidade espermática (CASA) e da integridade de membrana plasmática e de peça intermediária por meio de sondas fluorescentes. O TTRr não apresentou efeito dentro do tempo ($P > 0,05$) nos tempos 0, 10, 20 e 30 min; e desconsiderando-se o tempo, agrupando-se os dados, não se observou diferença entre tratamentos ($P > 0,05$), apresentando as seguintes respostas: Controle (29,79 \pm 13,47%), Insulina (26,87 \pm 16,14%), IGF-I (27,92 \pm 15,32%), Insulina + IGF-I (31,25 \pm 15,55%). No teste de Azul de Tripán e Giemsa, não se observaram efeitos dos tratamentos ($P > 0,05$) na expressão dos espermatozoides nas variáveis analisadas: vivos com acrossoma, vivos sem acrossoma, morto com acrossoma e morto sem acrossoma; mas ao se agruparem os tratamentos dentro de cada variável, para se realizar a comparação entre elas, independente dos tratamentos instituídos, os resultados observados foram: espermatozoides vivos com acrossoma (94,88 \pm 38,94^a), espermatozoides vivos sem acrossoma (19,92 \pm 19,54^b), espermatozoides mortos com acrossoma (75,38 \pm 44,98^a) e espermatozoides mortos sem acrossoma (10,42 \pm 8,66^b), havendo efeito nas variáveis ($P < 0,05$), analisadas pelo teste de Friedman. Nas análises pelo CASA, foram obtidos resultados relacionados à três variáveis apresentadas pelos espermatozoides: o movimento (progressivo rápido, lento, não progressivo e estático), a motilidade (estática, não progressiva e progressiva)

e a velocidade (rápida, média, lenta e estática), sendo que não se observaram efeitos dos tratamentos ($P > 0,05$) sobre qualquer uma dessas variáveis. E pelas sondas fluorescentes, foram analisados os efeitos dos tratamentos sobre as integridades das membranas plasmática e acrossomal e da peça intermediária do espermatozoide, também não se observando efeitos dos tratamentos ($P > 0,05$) nem dentro das células e peças intermediárias intactas, assim como das lesadas. A adição de Insulina e IGF-I, nas concentrações utilizadas, isoladamente ou combinadas, ao meio diluidor para congelamento de sêmen, não apresentou efeitos sobre a condição metabólica e estrutural das células espermáticas, diferentemente do que se observa sem a adição dessas substâncias.

Palavras-chave: criopreservação, IGF-I, metabolismo espermático.

Abstract

The objective of this study was to evaluate the metabolic and structural condition of bovine sperm cells after freezing by adding IGF-I and insulin in half thinner semen. We used 6 Nelore bulls, randomly selected from the breeding routine of a farm in the municipality of Grajaú (MA). The ejaculate of each bull was subjected to four treatments: G1 - Control; G2 - insulin; G3 - IGF-I; and G4 - insulin + IGF-I. Subjective analysis of motility was performed, turbulence and sperm vigor immediately after collection of the semen and after freezing were performed morphological and functional analysis (Quick Test thermometer - TTRR and staining with Trypan Blue and Giemsa), computerized analysis of sperm motility (HOME) and plasma membrane integrity and intermediate piece by means of fluorescent probes. The TTR-r had no effect within the time ($p > 0.05$) at 0, 10, 20 and 30 min; and disregarding the time (grouping the data), no difference was observed between treatments ($p > 0.05$), with the following answers: Control ($29.79 \pm 13.47\%$), insulin ($26, 16.14 \pm 87\%$), IGF-I ($27.92 \pm 15.32\%$) Insulin + IGF-I ($31.25 \pm 15.55\%$). In Blue test Tripan and Giemsa, there were no treatment effects ($p > 0.05$) in the expression of sperm (alive with acrosome, living without acrosome, killed with acrosome and killed without acrosome), which were the variables analyzed; but by grouping the treatments within each variable (to make a comparison between them, independent of established treatments), the results obtained were: living with sperm acrosome (94.88 ± 38.94 ; a), live sperm without acrosome (19.92 ± 19.54 b) with dead spermatozoa acrosome (75.38 ± 44.98 ; a) and without dead spermatozoa acrosome (10.42 ± 8.66 b), and the average

accompanied by different letters (a / b) differed significantly, ie was no effect on the variables ($P < 0.05$), as the Friedman test. In the analysis by CASA, results were obtained related to three variables presented by sperm: the movement (fast progressive, slow progressive, non-progressive and static), motility (static, non-progressive and progressive) and the speed (fast, medium, slow and static), and there were no treatment effects ($P > 0.05$) on any of these variables. And the fluorescent probes, the effects of treatments on the integrity of the plasma membrane and the middle piece of the sperm were analyzed, also not observed treatment effects ($P > 0.05$) or within cells and intact intermediate parts, as well as the injured. The addition of insulin and IGF-I, alone or combined, in half thinner for semen freezing did not result effects on metabolic and structural condition of the sperm cells unlike what is observed without the addition of chemicals.

Keywords: cryopreservation, IGF-I, sperm metabolism.

1. Introdução

A partir da década de 1950, a criopreservação do sêmen sofreu grande revolução com a descoberta do glicerol como agente crioprotetor (Walters *et al.*, 2009). Isso permitiu que o espermatozoide fosse congelado e armazenado por longos períodos (Holt, 2000). Entretanto, sabe-se que o mecanismo de criopreservação é adverso para esta célula, pois provoca estresse químico, osmótico, térmico e mecânico (Watson, 1995), levando a desestabilização da membrana plasmática, processo semelhante ao que ocorre durante a capacitação espermática (Bailey *et al.*, 2000). Considerando-se que o espermatozoide capacitado e/ou com acrossoma reagido possui um limitado tempo de vida, tal fato resulta em diminuição da fertilidade. Portanto, mesmo com as técnicas atuais de congelação, há uma redução expressiva da população espermática viável pós-descongelação (Arruda *et al.*, 2010).

Analisar a fertilidade do touro através da monta natural, observando aspectos como a taxa de prenhez é um método bastante seguro, mas é demorado e tem custo elevado. Por isso, surge a necessidade de se adotar métodos eficientes para estimar *in vitro* a fertilidade de touros, o que tem estimulado numerosos estudos buscando o desenvolvimento de provas laboratoriais que visam avaliar com maior acurácia os resultados da congelação de partidas de sêmen utilizadas nos programas de Inseminação Artificial (Arruda *et al.*, 2010). Como resultado, testes

complementares foram desenvolvidos para avaliar a integridade da membrana plasmática e a condição acrossomal dos espermatozoides, associadas ao exame físico do reprodutor.

Nesse sentido, a adição de hormônios como a Insulina e o IGF-I ao meio diluidor de sêmen para congelamento tem sido objeto de estudos. Suas funções já conhecidas como a da insulina no controle da glicemia, mantendo a homeostase da glicose, molécula importante como fonte energética para a célula, se aliam a descobertas da ação desses hormônios especialmente na funcionalidade do sistema reprodutor.

Abdelmonein *et al.* (1998) concluíram que a insulina teria participação na melhora da sobrevivência espermática por estimular a síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídeos, e por aumentar as funções intracelulares e da membrana plasmática. Wang e Hardy (2004) relataram a ação do IGF-I sobre receptores de LH e na produção da testosterona pelas células de Leydig. Para van Tilburg (2006), a insulina adicionada ao diluente de resfriamento influenciou favoravelmente a motilidade progressiva, retilinearidade, linearidade, frequência do batimento flagelar e integridade do acrossoma das células espermáticas.

Nesse contexto, justifica-se o acréscimo destes hormônios em meios diluidores para congelamento, com o intuito de melhorar a condição metabólica e estrutural da célula espermática após o processo criogênico, podendo favorecer com isso uma maior taxa de concepção.

2. Material e Métodos

Todas as técnicas e procedimentos utilizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (CETEA – UEMA, protocolo nº. --/2014).

Utilizou-se nesse trabalho a avaliação do sêmen com base em alguns parâmetros laboratoriais tradicionais (os testes funcionais), como: análise morfológica, Teste de Termorresistência Rápida (TTRr) e método da coloração pelo Azul de Tripán e Giemsa; além de associar a técnicas mais recentes, como: Sondas Fluorescentes e Análise Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA).

O delineamento utilizado foi em blocos ao acaso, sendo cada touro um bloco. A variável TTRr enquadrou-se em blocos ao acaso com parcelas subdivididas, onde o tempo de observação compreendeu cada parcela. Utilizou-se o programa BioEstat 5.0 para comparação das médias

encontradas. As variáveis paramétricas foram avaliadas pela ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Tukey, e as variáveis não paramétricas pelo teste de Friedman com significância de 5%. Todas as variáveis passaram pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Lilliefors.

2.1 Localização e dados climatológicos

O presente estudo foi realizado na Fazenda Soberana, localizada no município de Grajaú, que fica na região centro-sul do Estado do Maranhão (05°81'60'' de latitude sul e 46°16'22'' de longitude oeste, com 232 metros de altitude), apresentando os seguintes dados climatológicos: clima tropical com temperatura média de 28,5 °C, precipitação anual média de 1240 mm e umidade relativa do ar de 62% (Fonte: Estação Meteorológica de Observação de Superfície Automática Grajaú-A207 – INMET).

2.2 Animais experimentais

Do grupo de animais disponibilizados na propriedade para a realização do experimento, foram escolhidos touros que apresentavam características semelhantes na idade e no peso, com o fim de minimizar a influência do animal sobre os resultados. Assim, escolheram-se seis touros da raça Nelore que apresentavam peso e idade médios de 550 kg (\pm 45 kg) e 72 meses (\pm 6 meses), respectivamente, com um histórico favorável de boa qualidade dos seus descendentes.

2.3 Procedimento experimental

2.3.1 Preparo do diluidor

Nesse experimento, utilizou-se como solução diluidora o TRIS-GEMA a 20%, preparado conforme Leite (2008) (Anexo 01).

2.3.2 Materiais e procedimentos para coleta e congelamento do sêmen

As coletas de sêmen dos touros foram realizadas por eletroejaculação, fazendo-se a higienização do prepúcio antes de cada coleta, externamente com água e internamente com solução fisiológica, para evitar possíveis contaminações. Logo após coletado, foi acrescentada ao sêmen a solução diluidora TRIS-GEMA a 20% na proporção 1x1.

Após diluído, o sêmen foi levado ao laboratório anexo ao curral de coleta e lá foram feitas as primeiras avaliações, determinando-se subjetivamente a motilidade, o turbilhonamento e o vigor espermáticos. Para tanto, retirou-se, com auxílio de micropipeta, uma alíquota de 10 μ L do sêmen, colocando-se entre lâmina e lamínula para avaliação por microscopia óptica, conforme CBRA (1998).

Depois, para cada touro foram separados dois tubos Eppendorf com formol salino, um para cálculo da concentração (na diluição 1:200) e outro para análise da morfologia espermática, colocando-se alíquotas do sêmen diluído em cada tubo. Os tubos para cálculos da morfologia foram guardados sob refrigeração e levados para análise no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA). A relação dos materiais utilizados para a coleta e congelamento do sêmen está discriminada no Anexo 02.

A concentração da dose inseminante ficou pré-determinada em 12×10^6 espermatozoides viáveis por palheta de 0,25 mL, sendo obtida a partir da contagem na Câmara de Neubauer, segundo (CBRA, 1998) (Anexo 03).

2.3.3 Delineamento Experimental

Foram instituídos quatro tratamentos (G1-Controle, G2-Insulina, G3-IGF-I e G4-Insulina + IGF-I), onde o ejaculado de cada touro foi dividido entre os mesmos, bloqueando o efeito do touro. Assim, totalizaram-se 24 repetições (6 touros x 4 tratamentos). Os ejaculados foram separados em tubos tipo Falcon de 15mL, sendo diluídos para a concentração de 12×10^6 spz/palheta (dose inseminante, ou seja, 24×10^6 como dose total, contabilizando 50% de perda) e acrescidos com os reagentes (Insulina e IGF-I), de acordo com cada tratamento preconizado.

A dosagem da Insulina isolada (Grupo 02) foi de 100 μ UI/mL de sêmen diluído. A de IGF-I no Grupo 03 foi de 150 ng/mL. E no grupo 04 (onde os reagentes foram associados) as dosagens foram reduzidas à metade (50 μ UI/mL de Insulina + 75 ng/mL de IGF-I).

As palhetas de cada tratamento foram então envasadas, lacrando-as com álcool polivinílico. Ao todo foram produzidas 360 palhetas, que foram identificadas com cada tratamento e touro a que se referiam e que foram, posteriormente, utilizadas na realização das análises laboratoriais.

Para o resfriamento e congelamento do sêmen foi utilizado sistema programável de criopreservação de sêmen portátil (modelo TK-3000[®]) composto por um aparelho programável, equipado com um porta-palhetas de aço-inox, uma unidade ou tubo de resfriamento e uma caixa térmica para nitrogênio líquido, havendo ainda uma bateria para casos de queda de energia (Anexo 04).

No resfriamento, o aparelho foi programado para sair da temperatura ambiente até alcançar 5 °C, seguindo uma curva lenta de resfriamento (P1S2) de -0,5 °C/min, durando em torno de 150 a 180 min. Ao final desse tempo de equilíbrio, o porta-palhetas foi colocado na caixa térmica contendo nitrogênio líquido (numa altura de 7 cm dentro da caixa), na qual realizou-se a curva rápida de congelamento (P1S2) a uma taxa de -20 °C/min, saindo de 5 °C até -120 °C. Ao atingir esta temperatura, as palhetas foram colocadas em racks (também identificadas pelo nome do touro e do tratamento) para, em fim, serem imersas e armazenadas em botijões criogênicos com nitrogênio líquido, mantendo-as a uma temperatura de -196° C até o momento de realização das análises pós-descongelamento.

2.3.4 Análises laboratoriais

Foram realizadas cinco análises do sêmen pós-criopreservação, sendo elas:

1. Análise morfológica e Testes de Termorresistência Rápida e de coloração pelo Azul de Tripán e Giemsa, realizados no laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Estadual do Maranhão, em São Luís (MA);
2. Análise Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA) realizada no Laboratório de Tecnologia de Sêmen do Núcleo Integrado de Biotecnologia (NIB) da Universidade Estadual do Ceará (UECE), em Fortaleza(CE); e
3. Análise da integridade de membranas plasmática e acrossomal e de peça intermediária (função mitocondrial) com o uso de sondas fluorescentes, realizada

no Laboratório de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Piauí (UFPI), em Teresina (PI).

2.3.4.1 Análise Morfológica

Os tubos Eppendorf destinados à análise morfológica, preparados logo após a coleta com formol salino e alíquotas de sêmen, foram acondicionados no laboratório, em geladeira, até o dia da contagem. Nesse dia, para a realização da análise, colocou-se uma gota da solução em lâmina e levou-se ao microscópio óptico com contraste de fase, em preparação úmida, observando-se em objetiva de 100 com óleo de imersão, fazendo-se a contagem das alterações morfológicas em até 200 células, conforme CBRA (1998).

2.3.4.2 Teste de Termoresistência Rápida (TTRr)

Para esse teste, descongelou-se uma palheta de cada tratamento/touro em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, fazendo-se a observação da motilidade espermática logo após o descongelamento, no tempo zero (T0). Depois, o sêmen foi colocado em tubo Eppendorf e transferido para banho-maria a 45 °C onde foi mantido por 30 min, fazendo-se a motilidade a cada 10 min (T1 = 10min; T2 = 20min; T3 = 30min).

2.3.4.3 Azul de Tripán e Giemsa

O preparo da lâmina foi feito corando-a primeiro com o Azul de Tripán e depois com o Giemsa.

Para a incubação com o Azul de Tripán, inicialmente descongelou-se o sêmen colocando a palheta em banho maria a 37 °C por 30 segundos. Depois, foram misturados em um tubo Falcon 200 µL do sêmen com 200 µL do corante (previamente preparado numa solução a 0,4%) e feita a homogeneização. Deixou-se em banho-maria por 10 minutos e depois foi adicionado 2 mL de solução tampão PBS (Phosphate Buffered Saline), levando-se à centrífuga por 6 min à 1600 rpm (600G). Essa centrifugação foi repetida por duas vezes, retirando-se o sobrenadante e acrescentando-se mais 2 mL de PBS a cada repetição. Ao fim, uma alíquota de 10 µL do

sedimento foi colocada em lâmina para realização do esfregaço. Deixou-se secar a lâmina em mesa aquecedora e após seca, foi imersa em metanol. Passou por nova secagem e, ao fim, foi guardada para realização da coloração com o Giemsa, que seria feita posteriormente.

Para a coloração com o Giemsa, primeiro preparou-se a solução desse corante a 4% com água destilada. Todas as lâminas coradas no dia anterior com o azul de tripan foram, então, totalmente imersas nessa solução com Giemsa, ficando assim por 6 horas. Por fim, foi feita a secagem das lâminas em mesa aquecedora.

2.3.4.4 Análise Computadorizada da Motilidade Espermática (Computer Assisted Semen Analysis – CASA)

O aparelho para realização dessa análise, modelo HTM-IVOS (Versão 12.3, Hamilton-Thorne Bioscience), é composto por um microscópio que contém uma câmera na sua parte superior, acoplada a um computador, e também lâminas especiais que são as câmaras de leitura (Leja[®] standard count, SC20.01.FA, 20 micron), onde são colocadas as amostras do sêmen para observação e análise (Anexo 05). O computador, unicamente destinado para uso pelo sistema CASA, possui um software específico (Animal Motility), que faz as análises com base nas imagens geradas pela câmera, sendo previamente ajustado (setup) para análise de sêmen bovino.

O procedimento para análise compreende descongelar o sêmen em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, onde uma alíquota de 10µL é colocada na câmara de leitura que é levada ao microscópio. Durante a observação, pelo menos três campos distintos são selecionados (optando-se por aqueles com menos grumos). O sistema, então, capta automaticamente uma sequência de imagens de cada campo que são transformadas em imagens digitais e geram um filme mostrando o trajeto dos espermatozoides. Esses filmes são, então, analisados.

Na análise, são atribuídas diferentes cores aos trajetos dos espermatozoides, de acordo com o movimento que eles apresentam. Espermatozoides com movimento progressivo rápido aparecem na cor vermelha, com movimento progressivo lento, na cor verde, com movimento não progressivo, na cor azul, e sem movimento (estáticos), aparecem como pontos amarelos (Figura 01).

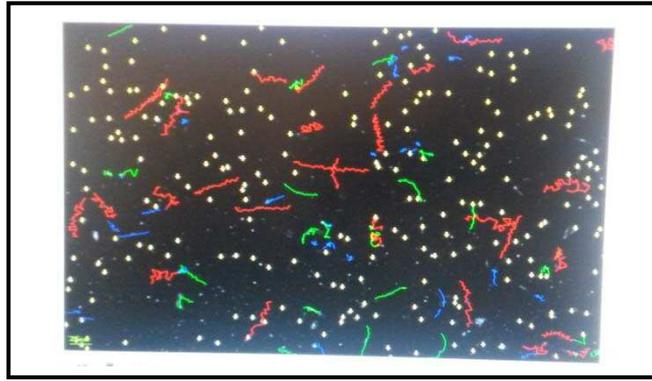


Figura 01: Imagem durante a análise pelo CASA, evidenciando as cores que o sistema atribui aos espermatozoides de acordo com a classificação do movimento.

O software Animal Motility fornece, como resultado de sua análise, uma série de características relacionadas ao movimento espermático, como: porcentagem de móveis, velocidade curvilínea (VCL), velocidade média da trajetória (VAP), velocidade linear progressiva (VSL), retilinearidade (STR), linearidade (LIN), dentre outras. Para fins deste estudo, os dados coletados do sistema e levados para análise estatística foram compilados em três categorias: de Movimento espermático (Progressivo Rápido, Progressivo Lento, Não-progressivo e Estático), de Motilidade espermática (Progressiva, Não-progressiva e Estática) e de Velocidade espermática (Rápida, Média, Lenta e Estática).

2.3.4.5 Análises por Sondas Fluorescentes

Inicialmente, foi preparado material para análise da integridade de membrana plasmática e de peça intermediária. Foram separados e identificados com o nome de cada touro/tratamento quatro grupos de dezoito tubos Eppendorf. Esses quatro grupos corresponderiam aos tratamentos testados. Os dezoito tubos Eppendorf em cada grupo formaram três sequências de seis tubos (correspondente aos seis touros), onde uma sequência serviria para observação da motilidade pós-descongelção, outra para análise de membrana plasmática e a última para análise de peça intermediária. A preparação inicial do material foi concluída colocando-se 150µL de TRIS em cada tubo destinado à análise da membrana plasmática e da peça intermediária.

Depois de separado esse material, seguiu-se para a preparação das sondas, conforme os procedimentos abaixo descritos:

a) Sondas para análise de membrana plasmática: o sêmen, após descongelado em banho-maria a 37 °C por 30 segundos, foi colocado na primeira sequência de tubos Eppendorf, correspondente a observação da motilidade subjetiva pós-descongelamento. Após observada a motilidade, uma alíquota de 50µL desse sêmen foi colocada na segunda sequência de tubos, onde já havia 150µL de TRIS. Posteriormente, foram adicionados mais 20µL de Iodeto de Propídio (PI) e 5µL de diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA) e feita a homogeneização.

b) Sondas para análise de peça intermediária (função mitocondrial): após descongelado o sêmen e observada a motilidade, uma alíquota de 50µL foi colocada na terceira sequência de tubos Eppendorf, onde também já havia 150µL de TRIS. Nessa sequência foi adicionada apenas mais uma substância, 5µL de iodeto de 5,5',6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarboianina (JC-I), fazendo-se, da mesma forma, a homogeneização.

Por fim, mantiveram-se os tubos Eppendorf's incubados por 10 min até se fazerem as leituras.

Para a leitura, uma alíquota de 10µL foi colocada entre lâmina e lamínula e feita a observação e a contagem em microscópio de epifluorescência com objetiva de 40x.

No caso da avaliação da membrana plasmática, duas colorações eram esperadas: espermatozoides com cabeça verde significavam membrana intacta, e com cor vermelha indicavam membrana lesada (Anexo 06). E para a avaliação da peça intermediária, aparecia a cor laranja, significando membrana intacta, e a cor verde, identificando membrana lesada (Anexos 07 e 08).

A terceira análise utilizando as sondas fluorescentes foi para observação da integridade do acrossoma do espermatozoide. Foi realizada separadamente das primeiras porque demanda um maior tempo e trabalho na sua preparação. Para essa análise, foi escolhida a conjugação do Isocianato de Fluoresceína (FITC) com a lecitina *Arachis hypogaea* (PNA).

Primeiro, foram preparadas separadamente as soluções de trabalho, necessárias no processo de coloração das lâminas para esse tipo de teste. Essas soluções que seriam posteriormente adicionadas às alíquotas de sêmen. São elas o meio de coloração PNA e o meio de montagem UCD.

a) Meio de Coloração PNA: foi adicionado PBS ao estoque liofilizado de FITC-PNA (Sigma-Aldrich) para fazer uma solução de 1 mg/mL. Alíquotas de 20µL dessa solução foram

colocadas em tubos Eppendorf, cobertas com papel alumínio e armazenadas em freezer, para serem descongeladas somente antes do uso.

b) Meio de montagem UCD: em um frasco de 10mL coberto com papel alumínio foi dissolvido 5mg de azida sódica em 0,5 mL de PBS. Depois foi adicionado 5mg de p-fenilenodiamine e mais 4,5 mL de glicerol, mantendo o pH dessa solução em 8,0. Alíquotas de 100 μ L desse meio foram colocadas em tubos Eppendorf, cobertas com papel alumínio e mantidas no freezer;

Após preparo dessas soluções, partiu-se para o procedimento de coloração das amostras.

Palhetas do sêmen foram descongeladas a 37 °C por 30 segundos, colocando-se alíquotas de 5 μ L sobre lâmina para fazer o esfregaço. Essas lâminas foram secadas ao ar por 5 min e depois colocadas em caixas de lâminas fechadas para posterior armazenamento em refrigeração a 4° C por no mínimo 24 h.

No momento da coloração, as alíquotas de 20 μ L do meio de coloração PNA foram descongeladas e diluídas em 480 μ L de PBS (alcançando uma concentração final de 100 μ g/mL). Depois, 30 μ L dessa solução de trabalho PNA foi pipetada no centro da lâmina e homogeneizada com inclinações sucessivas da lâmina de maneira que a solução cobrisse uma grande área desta. As lâminas produzidas foram armazenadas em tupeerware contendo toalhas de papel úmidas (para proporcionar uma atmosfera úmida), tampadas e cobertas com papel alumínio, e por fim, armazenadas em geladeira por 20 min. Após a coloração, as lâminas foram enxaguadas com 50mL de PBS e armazenadas em caixa de isopor para secagem.

Após secas, as lâminas foram submetidas ao contato com o meio de montagem UCD, colocando-se 5 μ L deste meio sobre a lâmina, cobrindo-a com lamínula limpa (20mm x 20mm), tendo-se o cuidado para não exceder essa quantidade de UCD sobre a lâmina, pois isso poderia prejudicar o material analisado.

Por fim, a lâmina foi avaliada em microscópio de epifluorescência com objetiva de 100x em óleo de imersão, usando-se um filtro de comprimento de onda 450-490nm e espelho dicromático de 510nm.

Para a leitura da lâmina, duas situações eram observadas: a) cabeça e/ou crista apical do espermatozoide na cor verde brilhante (efeito tocha fluorescente) significava acrossoma intacto; ou b) cabeça e/ou crista apical sem coloração verde brilhante na cabeça correspondia a acrossoma reagido ou danificado (Anexo 09).

3. Resultados

3.1 Exame Andrológico

Os dados relacionados ao exame andrológico dos touros alocados no experimento são apresentados nas Tabelas 01 e 02. Esses resultados referem-se ao exame físico testicular dos animais (destacando-se circunferência, comprimento e largura escrotais), às análises laboratoriais logo após a coleta, onde se observaram motilidade, turbilhonamento e vigor espermáticos e ao exame morfológico das células espermáticas.

Tabela 01. Biometria testicular e análise subjetiva inicial do sêmen de seis touros Nelore a serem alocados em experimento com quatro tratamentos distintos

	TOURO 01	TOURO 02	TOURO 03	TOURO 04	TOURO 05	TOURO 06
Motilidade	60	80	60	60	60	60
Turbilhonamento	3	2	1	2	1	2
Vigor	3	4	2	3	3	3
Circunferência escrotal	40	41	38	38,5	36	36
Comprimento escrotal direito	102	110	112	98	105	94
Largura escrotal direita	73	75	80	75	70	70
Comprimento escrotal esquerdo	108	111	110	90	110	98
Largura escrotal esquerda	78	74	80	77	72	74

Tabela 02. Análise da morfologia espermática dos touros Nelore a serem alocados em experimento com quatro tratamentos distintos (%)

	TOURO 01	TOURO 02	TOURO 03	TOURO 04	TOURO 05	TOURO 06
Normal	93	81	87	88	78	55
Calda dobrada (CD)	3	8	8	2	20	42
Delgado na base	1	---	---	---	---	1
Acrossoma	---	---	1	2	---	1
Gota proximal (GCP)	---	4	---	1	---	
Gota distal (GCD)	2	4	2	---	---	1
Piriforme	1	---	---	---	---	---
Cabeça delgada	---	---	---	7	---	---
Cabeça anormal	---	---	---	---	1	---
Forma teratológica	---	---	---	---	1	---
Cabeça isolada normal	---	2	2	---	---	---
Cabeça delgada na base	---	1	---	---	---	---

3.2 Teste de Termorresistência Rápida (TTRr)

Os resultados encontrados com a análise pelo Teste de Termorresistência Rápida são apresentados na Tabela 03.

Tabela 03. Média \pm EPM (%) dos resultados sobre a motilidade espermática avaliada pelo TTRr do sêmen criopreservado

Tempo (min)	CONTROLE	INSULINA	IGF-I	INSULINA + IGF-I
0	35,83 \pm 9,17	34 \pm 11	38 \pm 14	38 \pm 14
10	37 \pm 13	35 \pm 18,44	33,33 \pm 18,62	37,5 \pm 16,66
20	30 \pm 8,94	22,5 \pm 16,05	25 \pm 8,37	31,67 \pm 9,83
30	16,67 \pm 13,66	15,83 \pm 12,81	15,83 \pm 11,14	17,5 \pm 14,05

Motilidade progressiva retilínea pós-criopreservação, não houve diferença ($P > 0,05$) dentro do tempo no mesmo tratamento e também entre tratamentos, pelo Teste de Friedman.

Inicialmente esses dados foram analisados dentro de cada tratamento para avaliar a resposta nos diferentes tempos (0, 10, 20 e 30 min), concluindo-se que o TTRr não apresentou efeito dentro do tempo ($P > 0,05$), pelo teste de Friedman.

Não havendo diferença estatística, foram agrupados para comparação das médias entre os tratamentos, não levando em consideração o tempo, obtendo-se as seguintes respostas: Controle (29,79 \pm 13,47%), Insulina (26,87 \pm 16,14%), IGF-I (27,92 \pm 15,32%), e Insulina + IGF-I (31,25 \pm 15,55%). Também não foi observada diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$).

3.3 Azul de Tripan e Giemsa

Essa associação de corantes vitais (Trypan blue e Giemsa - TBG) visa avaliar, simultânea e respectivamente, a viabilidade e a condição acrossomal da célula espermática. O Trypan blue detecta espermatozoides mortos, com membrana lesada, corando-os em azul, enquanto que espermatozoides intactos (vivos) não se coram. Já o Giemsa indica ausência ou presença do acrossoma, corando em roxo ou rosa escuro o acrossoma intacto.

Assim, na análise pela coloração com TBG, quatro categorias de espermatozoides são observadas: a) vivo com acrossoma intacto; b) morto com acrossoma intacto; c) vivo sem

acrossoma; e d) morto sem acrossoma. A tabela 04 apresenta os resultados obtidos com essa análise.

Tabela 04. Média \pm DPM dos resultados do Teste de Azul de Tripán e Giemsa efetuado no sêmen criopreservado

	SPTZ VIVO COM ACROSSOMA	SPTZ VIVO SEM ACROSSOMA	SPTZ MORTO COM ACROSSOMA	SPTZ MORTO SEM ACROSSOMA
Controle	95,33 \pm 37,41	3,73 \pm 2,85	76,5 \pm 41,19	8 \pm 4,05
Insulina	95 \pm 44,28	4,18 \pm 2,1	78,33 \pm 48,12	7,17 \pm 9,48
IGF-I	94,5 \pm 42,6	3,74 \pm 1,79	74 \pm 55,34	15 \pm 7,16
Insulina + IGF-I	94,67 \pm 42,43	4,25 \pm 1,94	72,67 \pm 47,01	11,5 \pm 11,9

SPTZ: espermatozoide.

Com relação às categorias observadas, os tratamentos instituídos não causaram efeitos diferentes do que foi observado no grupo controle. E, uma vez que não se observaram efeitos, os tratamentos foram agrupados dentro de cada categoria para comparação entre as mesmas, independente dos tratamentos instituídos, obtendo resultados conforme apresentados na figura 02.

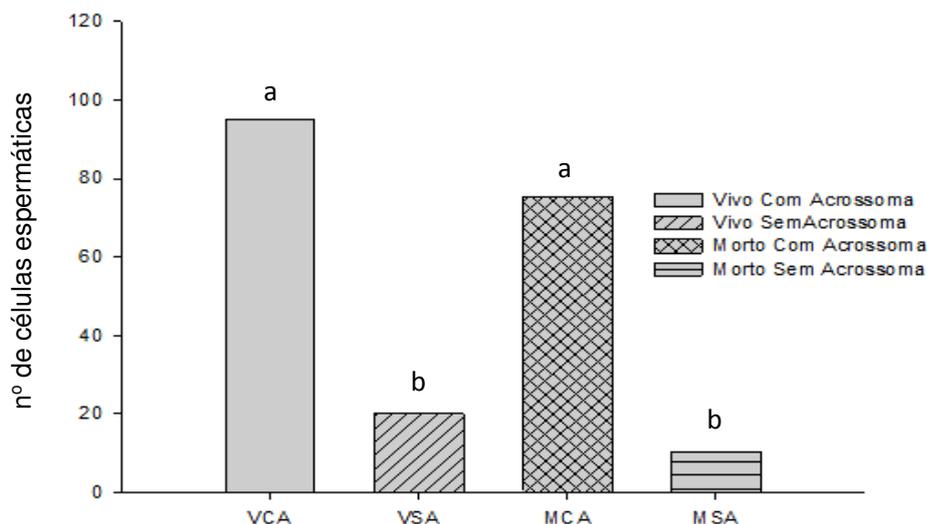


Figura 02: Análise das células espermáticas após TBG. Letras distintas diferem pelo teste de Friedman ($P < 0,05$).

Observou-se que houve diferença entre as categorias espermáticas ($P < 0,05$). Contudo, nessa análise, essas categorias foram tratadas como não paramétricas, tendo em vista que não passaram pelo teste de normalidade (Lilliefors e Shapiro-Wilk), mesmo tentando-se a transformação linear e/ou logarítmica.

3.4 Análise Computadorizada da Motilidade Espermática (CASA)

Os resultados obtidos na análise pelo CASA foram classificados segundo três variáveis: movimento, motilidade e velocidade espermática. Esses dados são mostrados, respectivamente, nas tabelas 05, 06 e 07.

Tabela 05. Média \pm DPM dos resultados da análise computadorizada do movimento espermático feita pelo sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) no sêmen após a descongelção

	MOVIMENTO PROGRESSIVO RÁPIDO	MOVIMENTO PROGRESSIVO LENTO	MOVIMENTO NÃO PROGRESSIVO	ESTÁTICO
Controle	4,03 \pm 2,75	7,17 \pm 5,85	19,15 \pm 12,67	69,65 \pm 20,06
Insulina	4,92 \pm 3,35	7,38 \pm 5,47	22,48 \pm 14,7	65,22 \pm 22,84
IGF-I	5,10 \pm 4,10	8,32 \pm 7,94	23,35 \pm 18,94	63,23 \pm 29,96
Insulina + IGF-I	3,60 \pm 3,01	5,78 \pm 4,60	20,53 \pm 14,07	70,1 \pm 21,32

Tabela 06. Média \pm DPM dos resultados da análise computadorizada da motilidade espermática feita pelo sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) no sêmen após a descongelção

	ESTÁTICA	MOTILIDADE NÃO PROGRESSIVA	MOTILIDADE PROGRESSIVA
Controle	69,65 \pm 20,06	22,77 \pm 14,94	7,58 \pm 5,36
Insulina	69,22 \pm 22,84	25,58 \pm 17,64	9,2 \pm 6,29
IGF-I	63,23 \pm 29,96	27,83 \pm 24,25	8,93 \pm 6,82
Insulina + IGF-I	70,1 \pm 21,32	22,58 \pm 15,94	7,32 \pm 5,69

Tabela 07. Média \pm EPM dos resultados da análise computadorizada da velocidade espermática feita pelo sistema CASA (Computer Assisted Semen Analysis) no sêmen após a descongelção

	VELOCIDADE RÁPIDA	VELOCIDADE MÉDIA	VELOCIDADE LENTA	ESTÁTICO
Controle	7,65 \pm 5,75	9,07 \pm 6,38	13,63 \pm 8,79	69,65 \pm 20,06
Insulina	7,97 \pm 6,25	10,98 \pm 7,82	15,83 \pm 9,28	65,22 \pm 22,84
IGF-I	9,6 \pm 8,83	12,18 \pm 12,18	15 \pm 9,71	63,23 \pm 29,96
Insulina + IGF-I	5,62 \pm 4,94	9,58 \pm 7,37	14,72 \pm 9,35	70,1 \pm 21,32

Todos esses dados foram submetidos aos testes de normalidade Lilliefors, Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, sendo considerados normais em todos os casos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey através da análise de variância (ANOVA).

Nas três variáveis consideradas (movimento, motilidade e velocidade espermáticos), não se constataram diferenças estatísticas entre os tratamentos instituídos comparando-os com o que foi observado no grupo Controle.

3.5 Sondas Fluorescentes

As análises com o uso de sondas fluorescentes objetivaram resultados relacionados a três variáveis: (1) integridade das membranas plasmática e (2) acrossomal e também (3) de peça intermediária dos espermatozoides. Esses resultados são apresentados nas tabelas 08, 09 e 10.

Tabela 08. Média \pm DPM dos resultados da análise por sondas fluorescentes para observação da integridade de membrana plasmática de espermatozoide no sêmen após a descongelção

	MEMBRANA INTACTA	MEMBRANA LESADA
Controle	51,5 \pm 21,51	48,5 \pm 21,51
Insulina	55,67 \pm 19,53	44,33 \pm 19,53
IGF-I	51,67 \pm 25,86	48,33 \pm 25,86
Insulina + IGF-I	40,33 \pm 17,99	59,67 \pm 17,99

Tabela 09. Média \pm DPM dos resultados da análise por sondas fluorescentes para observação da integridade de membrana acrossomal dos espermatozoides após a descongelção

	ACROSSOMA INTACTO	ACROSSOMA LESADO
Controle	66 \pm 18,18	34 \pm 18,18
Insulina	52,5 \pm 22,94	47,5 \pm 22,94
IGF-I	54,67 \pm 28,51	45,33 \pm 28,51
Insulina + IGF-I	73,5 \pm 10,23	26,5 \pm 10,23

Tabela 10. Média \pm DPM dos resultados da análise por sondas fluorescentes para observação da integridade de peça intermediária de espermatozoide após a descongelção

	PEÇA INTERMEDIÁRIA INTACTA	PEÇA INTERMEDIÁRIA LESADA
Controle	16 \pm 9,55	84 \pm 9,55
Insulina	23,33 \pm 21,81	76,67 \pm 21,81
IGF-I	27,5 \pm 19,27	72,5 \pm 19,27
Insulina + IGF-I	26,83 \pm 24,71	73,17 \pm 24,71

Todos esses dados foram submetidos aos testes de normalidade Lilliefors e Shapiro-Wilk. Quanto à análise das membranas plasmática e acrossomal, foram considerados normais, mas quanto à análise de peça intermediária, houve significância, pelo que precisaram ser transformados pela função logarítmica para apresentarem normalidade. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey através da análise de variância (ANOVA).

Pela análise dos dados obtidos, constatou-se que os tratamentos instituídos não provocaram efeitos ($P > 0,05$) nem para as membranas plasmática e acrossomal e nem para a peça intermediária. Não houve diferença também dentro das células ou peças intermediárias intactas, assim como das que se apresentaram lesadas.

No entanto, cabe observar que na análise da membrana acrossomal houve tendência ao melhor resultado do tratamento Insulina + IGF-I ($P > 0,06$), merecendo destaque.

4. Discussão

Os touros alocados no experimento apresentavam média de idade de 72 meses. Conforme Pacheco et al. (2007), em estudo analisando o efeito da idade sobre as características

seminais e o perímetro escrotal, constataram que em animais com 72 meses de idade não houve diferença significativa para as características morfológicas, estando as médias dentro do padrão determinado pelo CBRA (1998).

Segundo Martí et al. (2011), à medida que se aumenta a idade, ocorre também um aumento no percentual de células espermáticas com membrana intacta quando o espermatozoide é submetido ao processo de criopreservação, e que talvez esse aumento da competência estrutural e funcional associada à capacidade de crioresistência possa estar relacionado ao volume da cabeça do espermatozoide, uma vez que esse diminui com o avanço da idade e as características indicativas de boa congelabilidade aumentam.

Para Arruda et al. (2010), no que se refere à avaliação da morfologia, as causas de defeitos espermáticos podem ser de origem ambiental, genética ou a combinação de ambas, sendo bastante variável (0,06 a 0,86) a correlação entre a morfologia dos espermatozoides e sua relação com a fertilidade.

Mas para Brito (2007), apesar do exame da morfologia espermática sozinho nunca poder justificar a afirmação de que a fertilidade potencial de um ejaculado é alta, é razoável afirmar que ela será baixa quando uma alta proporção de espermatozoides tem anormalidades. Assim, considerando que o CBRA (1998) recomenda para ejaculados de touros um percentual mínimo de 70% de espermatozoides normais e, observando os resultados mostrados na tabela 02, constatou-se que o touro de número 06 utilizado neste experimento apresentou características morfológicas abaixo das mínimas para ser considerado apto à reprodução. Apesar disso, como o objetivo deste estudo não era testar os animais, mas sim os tratamentos instituídos sobre a qualidade espermática pós-congelamento, optou-se por manter este animal no experimento, uma vez que o mesmo seria bloqueado dentro dos tratamentos.

No que diz respeito aos testes utilizados no experimento, trabalhos publicados atestam a eficiência deles na predição da viabilidade espermática. Emerick et al. (2011) citaram o TTR como sendo um teste sensível em relação à motilidade pós congelamento, trazendo informação adicional na avaliação de sêmen bovino criopreservado. Tartaglione e Ritta (2004) trabalharam com o Trypan blue e Giemsa para avaliar a condição acrossomal de espermatozoides criopreservados de touros e observaram que este teste apresentou alta correlação com a fertilidade.

Partyka et al. (2012), relataram que os métodos convencionais de avaliação espermática em conexão com a análise computadorizada da motilidade espermática (CASA) têm

possibilitado aos pesquisadores obter informações mais precisas sobre o estado morfofuncional dos espermatozoides e os mecanismos de criolesão. Celeghini et al. (2010) comentaram que as associações de sondas fluorescentes permitem avaliar, concomitantemente, vários compartimentos da mesma célula espermática, aumentando a precisão das análises de sêmen, fato que se torna possível em virtude da capacidade das sondas de se ligarem a compartimentos específicos das células.

Para Silva e Guerra (2012), nenhum teste laboratorial isoladamente é capaz de determinar o potencial de fertilidade dos espermatozoides, sendo a melhor forma de predição da qualidade de uma amostra seminal e do seu potencial fecundante a realização conjunta de técnicas de avaliação para as diferentes características espermáticas.

Neste estudo, não se observou diferença entre os tratamentos instituídos se comparados com o grupo controle.

Quanto ao IGF-I, esse resultado contrasta com o que concluíram Henricks et al. (1998) que identificaram a presença do desse hormônio no plasma seminal de bovinos, destacando uma relação positiva (mas variável) do IGF-I com a morfologia e a motilidade espermáticas.

Para Hoeflich et al. (1999), no entanto, embora o trabalho de Henricks et al. (1998) tenha observado efeito positivo significativo do IGF-I sobre a motilidade espermática bovina no sistema *in vitro*, este efeito deve ser reconsiderado nas condições *in vivo*, onde quantidades substanciais de proteínas ligadoras de IGF (as IGFBP's) estão presentes no plasma seminal bovino e também porque a condição artificial pode modificar a meia-vida e as interações dos receptores de IGF dos espermatozoides.

Henricks et al. (1998), apesar de concluir pela relação positiva do IGF-I na morfologia e na motilidade espermáticas, atenta que a biodisponibilidade do IGF-I (evento mediado pelas IGFBP's), sofre influência da presença, nas glândulas sexuais acessórias, de um antígeno prostático capaz de clivar o IGF-I de suas proteínas de ligação, sugerindo que este hormônio conjugado com suas proteínas só está biodisponível imediatamente antes ou após a ejaculação, constituindo este um fator limitante à ação do IGF.

Hoeflich et al. (1999) corroboram acrescentando que a ação moduladora das proteínas ligadoras de IGF (as IGFBP's) sofre influência da concentração e do sítio de ação. Uma dessas IGFBP's (a IGFBP-3) foi relatada como tendo ação diminuidora da afinidade do receptor de IGF-I para o seu ligante, apresentando, assim, influência negativa na ação do IGF. No mesmo sentido, Miao et al. (1998) mostraram que a associação de IGF-I e IGFBP-3 ao meio de

incubação não causou alteração, estatisticamente significativa, nos parâmetros de motilidade espermática, diferente do que ocorria com o IGF-I isoladamente.

Hoeflich et al. (1999) falaram ainda da ação das proteases como modificadoras das IGFBP's. Para eles, essas enzimas seriam moduladoras-chave das ações do IGF. Miao et al. (1998) demonstraram que essas proteases são observadas no soro e no plasma seminal, e que a proteólise de uma IGFBP diminui sua afinidade de ligação com o IGF, afetando assim a sua biodisponibilidade. Para Peterson et al. (1998), as proteases, específicas para IGFBP's, é um outro nível de controle regular da biodisponibilidade do IGF nos tecidos.

Quanto aos resultados observados sobre a Insulina, onde também não houve diferença estatística, eles contrastam com os dados encontrados por van Tilburg (2006), que adicionou Insulina em sêmen criopreservado e concluiu que ela influenciou favoravelmente a motilidade, a cinemática e principalmente a integridade de acrossoma. Esse estudo de van Tilburg foi realizado em ovinos.

Já o trabalho de Lampiao e du Plessis (2008), analisando em diferentes tempos o efeito da Insulina sobre a motilidade total e progressiva de espermatozoides humanos, não observaram diferença na primeira hora de incubação do grupo tratado com Insulina se comparado com o grupo controle. Nesse trabalho de Lampiao e du Plessis não houve congelamento de sêmen.

Aquila et al. (2005), relataram que os espermatozoides no ejaculado são capazes de secretar Insulina. Essa pode ser uma resposta autônoma da célula espermática para lhe garantir substrato durante todo o trato reprodutivo masculino e feminino e, assim, garantir o sucesso na fertilização. A insulina liberada age indiretamente na via da pentose fosfato (PPP), através da regulação da enzima G6PDH, tendo como resultado a produção de NADPH. Este último vai agir nos eventos relacionados com a capacidade do espermatozoide se fundir com o oócito.

Trabalho de Uner e Sakkas (1999) concluiu que o espermatozoide precisa gerar NADPH através da PPP a fim de alcançar a fecundação. No entanto, a concentração dessa enzima NADPH precisa estar finamente equilibrada. A hiperatividade da via das pentoses pode danificar o espermatozoide, assim como a pouca estimulação pode tornar a célula espermática incapaz de fecundar. Dessa forma, a insulina produzida pelo espermatozoide tem ação na indução da capacitação, conforme alcance sua concentração limite.

Neste estudo, apesar de não se ter encontrado diferença estatística, a motilidade e o movimento espermático total apresentaram maior valor numérico nos tratamentos que receberam apenas IGF-I, corroborando o trabalho de Nakayama e Yamamoto (1999), que em

estudo sobre a influência de IGF-I, IGF-II e Insulina na promoção do crescimento e diferenciação dos espermatozoides, relataram que o IGF-I era mais potente do que o IGF-II, enquanto que a insulina era o menos potente.

Trabalhos de Henricks et al. (1998) e Selvaraju et al. (2009) citam também as concentrações de IGF-I capazes de manter a motilidade espermática superior à do grupo controle citando, nos dois trabalhos, a concentração de 100 ng/mL. No presente estudo foi utilizada a concentração de 150 ng/mL de IGF-I isolado. Cabe destaque, no entanto, da análise da membrana acrossomal feita por sonda fluorescente em que o grupo testado com a associação de Insulina e IGF-I nas doses respectivas de 50 μ UI/mL e 75 ng/mL obteve o melhor resultado ($P = 0,06$), quase apresentando diferença estatística se comparado ao grupo controle. Deixa-se aqui, abertura para novas pesquisas com novas dosagens.

8. Conclusão

Com base nos resultados obtidos, dentro das condições realizadas neste experimento, conclui-se que a adição de Insulina e IGF-I ao meio diluidor de sêmen criopreservado de bovinos: não causou mudanças na integridade das membranas plasmática e acrossomal e na condição metabólica da célula espermática; não influenciou a motilidade das células espermáticas após a criopreservação e não aumentou a taxa de células espermáticas não capacitadas após o descongelamento.

Referências Bibliográficas

ABDELMONEIN, I. Y.; BETH, R.; SABA, K.; et al. The effects of antifreeze peptide III (AFP) and insulin transferrin selenium (ITS) on cryopreservation of chimpanzee (*Pan troglodytes*) spermatozoa. **Journal of Andrology**, v.19, n.2, p.207-21, 1998.

AQUILA S.; GENTILE M.; MIDDEA E.; et al. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. **Endocrinology**, v.146, n.2, p.552-557, 2005.

ARRUDA, R. L.; ORROS, I. R.; PASSOS, T. S.; et al. **Técnicas para avaliação laboratorial da integridade estrutural e funcional do sêmen congelado de touros**. Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.34, n.3, p.168-184, jul./set. 2010.

BAILEY, J. L.; BILODEAU, J.; CORMIER, N. Semen Cryopreservation in Domestic Animals: A Damaging and Capacitating Phenomenon. **Journal of Andrology**, v.21, n.1, p.1-7, 2000.

BRITO, L.F.C. Evaluation of stallion sperm morphology. **Clinical and Technology in Equine Practice**, v.6, p.249-264, 2007.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL - CBRA. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 2.ed. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49p.

CELEGHINI, E. C. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; et al. Simultaneous assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes of ram sperm by fluorescent probes. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.62, n.3, p.536-543, 2010.

EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; VALE FILHO, V. R.; et al. Avaliação de integridade de membrana de espermatozoides bovino criopreservado para prever o índice de prenhez. **Cienc. Anim. Bras.**, v.12, n.3, p.536-546, jul./set. 2011.

HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R. et al. Identification of insulin-like growth factor I in bovine seminal plasma and its receptor on spermatozoa: Influence on Sperm Motility. **Biology of Reproduction**, Bristol, v.59, n.2, p.330-337, 1998.

HOEFLICH, A.; REICHENBACH, H.-D.; SCHWARTZ, J. et al. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. **Domestic Animal Endocrinology**, Elsevier Science Inc., v.17, p.39-51, 1999.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v.62, p.3-22, 2000.

LAMPIAO, F.; du PLESSIS, S. S. Insulin and leptin enhance human sperm motility, acrosome reaction and nitric oxide production. **Asian Journal of Andrology**, v.10, n.5, p.799-807, 2008.

LEITE, T. G. **Tempo de equilíbrio na criopreservação do sêmen: efeitos sobre características de motilidade e de integridade das membranas espermáticas de touros gir leiteiro**. 2008. 122f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MARTÍ, J. I.; APARICIO, I. M.; GARCÍA-HERREROS, M. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity. **Theriogenology**, v.75, p.473-481, 2011.

MIAO, Z-R; LINT, T. K.; BONGSOT, T. A. et al. Effect of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins on in vitro sperm motility. **Clinical Endocrinology**, v.49, p.235-239, 1998.

NAKAYAMA Y., YAMAMOTO T., ABE S.I. IGF-I, IGF-II e insulin promote differentiation of spermatogonia to primary spermatocytes in organ culture of new testes. **International Journal Developmental Biology**, v.43, n.4, p.343-347, 1999.

PACHECO A.; QUIRINO C. R.; SILVA J. F. S.; et al. Efeito da idade e de fazenda sobre as características seminais e perímetro escrotal em touros da raça Guzerá criados no norte e noroeste do Rio de Janeiro, Brasil. **Arch. Latinoam. Prod. Anim.** v.15, n.4, p.165-173, 2007.

PARTYKA, A.; NIŻAŃSKI, W.; OCHOTA, M.; Methods of assessment of cryopreserved semen. In: *Current Frontiers in Cryobiology*. InTech Open Access Publisher, p.547-574, 2012.

PETERSON, A. J.; LEDGARD, A. M.; HODGKINSON, S. C.; The proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins in ovine uterine luminal fluid. **Reproduction, Fertility and Development**. v.10, p.309-314, 1998.

SELVARAJU, S.; REDDY, I. J.; NANDI, S.; et al. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal Reproduction Science**, v.113, p. 60-70, 2009.

SILVA, E. C. B.; GUERRA, M. M. P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.11, n.2, p. 162-169, 2012.

TARTAGLIONE, C. M.; RITTA, M. N. Prognostic value of spermatic parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v.62, p.1.245-1.252, 2004.

URNER, F.; SAKKAS, D. A possible role for the pentose phosphate pathway of spermatozoa in gamete fusion in the mouse. *Biology of Reproduction*, v.60, n.3, p.733–739, 1999.

VAN TILBURG, M. F.; **Influência da insulina no congelamento e resfriamento do sêmen ovino**. 2006. 86f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro.

WALTERS, E. M.; BENSON, D. J.; WOODS, E. J; et al. The history of sperm cryopreservation. In: *Sperm banking. Theory and practice*. Cambridge University Press, 2009.

WANG, G.; HARDY, M.P. Development of Leydig cells in the insulin-like growth factor-I (IGF-I) knockout mouse: effects of IGF-I replacement and gonadotropic stimulation. **Biology of Reproduction**, Bristol, v. 70, n. 3, p. 632-639, 2004.

WATSON, P. F. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.7, n.4, p.871–891, 1995.

ANEXOS

ANEXO 01 - Composição do diluidor TRIS/GEMA a 20%

Ingredientes	Quantidade
Tris (tris(hidroximetil)aminometano)	2,42 g
Ácido cítrico P.A.	1,36 g
Frutose P.A.	1,0 g
Gema de ovo	20 mL
Glicerol P.A. 99,5% (Glicerina)	7 mL (7% v/v)
Penicilina G potássica	0,028 g
Água destilada deionizada q.s.p.	*q.s.p. para 100 mL

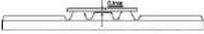
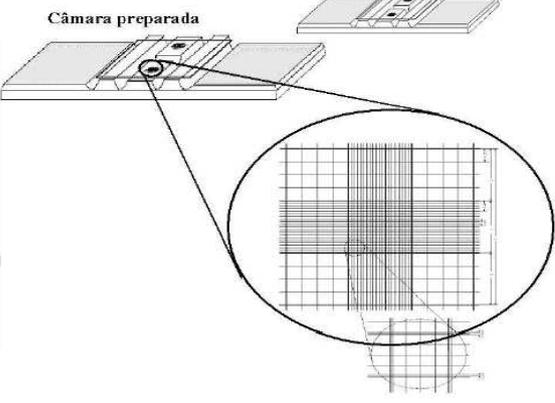
(*) q.s.p. – quantidade suficiente para completar o volume de 100 mL. P.A. – Puro para Análise
Fonte: Leite, 2008

ANEXO 02 - Relação dos materiais utilizados para coleta e congelamento do sêmen



- 1- Microscópio óptico;
- 2- vortéx
- 3- Caixa contendo os seguintes materiais: luvas de procedimento, álcool polivinílico, papel toalha, lâminas e lamínulas; tubos Falcon de 5 e 15 mL; tubos Eppendorf de 1,5 mL; palhetas de 0,25 e 0,5 mL; Câmara de Neubauer; pipetas de 10 a 100 μ L; ponteiras; raques para estocagem do sêmen; esparadrapo; solução de formol salino
- 4- banho-maria;
- 5- botijões com Nitrogênio líquido;
- 6- eletrojaculador;
- 7- Máquina de congelamento TK-3000;
- 8- extensão de energia;
- 9- caixa de isopor contendo funis e, além destes, também foram utilizados mesa aquecedora e Becker de 500 mL contendo o diluidor congelado.

ANEXO 03 – Detalhes da Câmara de Neubauer e a descrição da fórmula para cálculo da concentração espermática

DETALHES DA CÂMARA DE NEUBAUER	
Montagem da câmara	
Detalhe da câmara - altura	
Alimentação da câmara	
Câmara preparada	

Fonte: Papa, et al., 2011

A fórmula para cálculo da concentração, conforme CBRA (1998) é a seguinte:

$$n = \frac{A}{\frac{1}{B} \times \frac{N}{25} \times \frac{1}{10}}$$

onde:

- n = número de espermatozoides/mm³
- A = número de espermatozoides contados na câmara;
- B = fator de diluição (1:200; 1:100; ...);
- N = número de quadrados grandes contados - superfície contada;
- 1/10 = altura da câmara

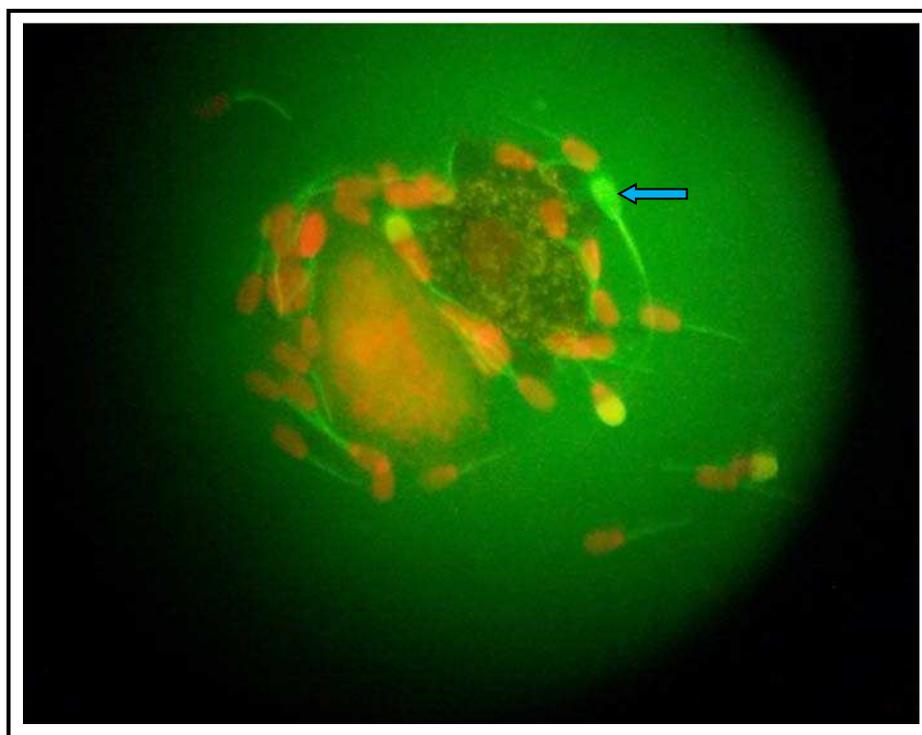
ANEXO 04 – Sistema programável para criopreservação de sêmen TK-3000[®] 1) aparelho programável; 2) tubo de resfriamento adaptado com porta palhetas e 3) caixa térmica para nitrogênio líquido.



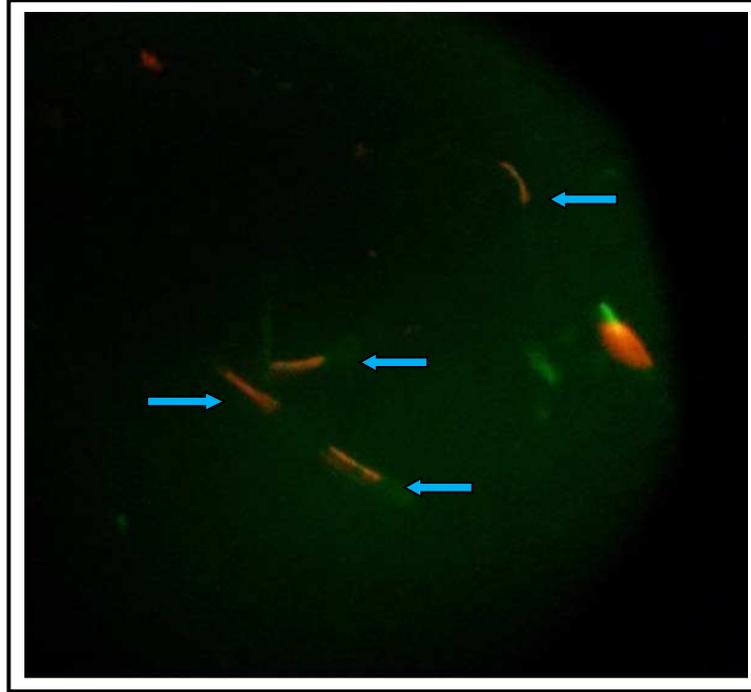
ANEXO 05: Aparelho para análise pelo CASA. A) Visão geral destacando o computador (1), o microscópio acoplado à câmera (seta) (2) e a mesa aquecedora com as câmaras de leitura (3); B) Visão das câmaras de leitura na mesa aquecedora



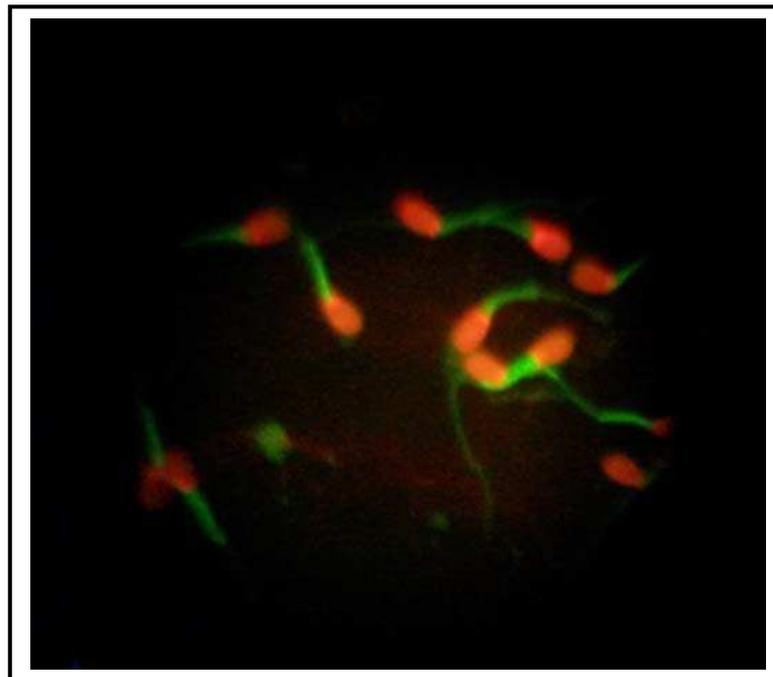
ANEXO 06 – Análise de integridade de membrana plasmática por sondas fluorescentes. A seta mostra um espermatozoide íntegro na coloração verde. Os outros apresentam-se lesados.



ANEXO 07 – Análise de peça intermediária (função mitocondrial) por sondas fluorescentes. As setas mostram espermatozoides íntegros com coloração laranja.



ANEXO 08 – Análise de peça intermediária (função mitocondrial) por sondas fluorescentes evidenciando alguns espermatozoides lesados na lâmina.



ANEXO 09 – Análise de membrana acrossomal por sondas fluorescentes evidenciando alguns espermatozoides íntegros na lâmina.

