



## Insulina e IGF-1 no meio extensor de criopreservação seminal bovina

[*Insulin and IGF-I in extender medium for bovine semen cryopreservation*]

O.J.S. Costa<sup>1</sup>, D.S. Almeida<sup>1</sup>, S.C.C. Pinto<sup>2</sup>, R.M. Chaves<sup>1</sup>,  
L.M. Laskoski<sup>3</sup>, F.A. Souza<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Maranhão - São Luís, MA

<sup>2</sup>Universidade de São Paulo - Pirassununga, SP

<sup>3</sup>Universidade Federal do Acre - Rio Branco, AC

### RESUMO

Objetivou-se avaliar a condição metabólica e estrutural das células espermáticas bovinas após congelação, com adição prévia de IGF-I e insulina no meio diluidor seminal. Os ejaculados de seis touros Nelore foram submetidos a quatro tratamentos: controle; insulina (100µUI/mL); IGF-I (150ng/mL) e insulina + IGF-I (50µUI/mL e 75ng/mL, respectivamente). Após a congelação, realizaram-se os testes de termorresistência rápida, coloração pelo corante azul de tripan e Giemsa, além da análise computadorizada da motilidade espermática, da integridade das membranas plasmática e acrossomal, e da peça intermediária por meio de sondas fluorescentes. O teste de termorresistência rápida apresentou efeito dentro do tempo de cada tratamento, mas não entre os tratamentos. Na análise computadorizada da motilidade espermática, foram observados movimento, motilidade e velocidade espermáticos; não houve efeitos dos tratamentos sobre qualquer uma dessas variáveis. Respostas iguais foram obtidas com as sondas fluorescentes e o corante azul de tripan/Giemsa. A adição de insulina e IGF-I, de forma isolada ou combinada, ao meio diluidor para congelação de sêmen não produziu efeitos sobre as condições metabólica e estrutural das células espermáticas.

Palavras-chave: criopreservação, IGF-1, metabolismo espermático

### ABSTRACT

*This study aimed to evaluate the metabolic and structural condition of the spermatic bovine cells after the freezing, with addition, previously, of IGF-I and Insulin in the seminal thinner medium. The semen of 6 Nelore bulls were submitted to four treatments: Control, Insulin (100µUI/mL); IGF-I (150ng/mL) and Insulin + IGF-I (50µUI/mL and 75ng/mL, respectively). After freezing, rapid resistance tests, Tripan and Giemsa Blue staining, and computerized analysis of sperm motility and integrity of the plasma and acrosomal membranes and the intermediate part were performed by fluorescent probes. The term rapid resistance test had effect within the time of each treatment, but not between treatments. In the computer analysis of sperm motility, sperm movement, motility and velocity no effects of treatments were observed on any of these variables. The same results were obtained with the fluorescent probes and the Blue dye Trypan / Giemsa. The addition of Insulin and IGF-I, alone or in combination, to the semen freezing dilution medium had no effect on the metabolic and structural condition of sperm cells.*

Keywords: cryopreservation, IGF-I, spermatic metabolism

### INTRODUÇÃO

A descoberta do glicerol como agente crioprotetor, na década de 1950, causou grande revolução na criopreservação, pois permitiu a congelação e o armazenamento do espermatozoide por longos períodos (Walters *et*

*al.*, 2009). Sabe-se hoje, porém, que o mecanismo de criopreservação é adverso para essa célula, pois provoca estresse químico, osmótico, térmico e mecânico, levando à desestabilização da membrana plasmática, processo semelhante ao que ocorre durante a capacitação espermática (Bailey *et al.*, 2000). Considerando que o espermatozoide capacitado e/ou com acrossoma reagido tem limitado

Recebido em 23 de janeiro de 2019

Aceito em 30 de setembro de 2019

E-mail: femedvet@yahoo.com.br

tempo de vida, tal fato resulta em diminuição da fertilidade.

As técnicas atuais de congelamento ainda não conseguiram evitar a redução expressiva da população espermática viável pós-descongelamento (Arruda *et al.*, 2010). 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, pois esses hormônios estão intimamente relacionados com a função reprodutiva, estimulando e preservando o metabolismo espermático e a integridade das membranas. O IGF-1 é um peptídeo com ação mediada pelos receptores tipo tirosina quinase – receptor tipo I (Luz *et al.*, 2015), sendo responsável por estimular e preservar a motilidade espermática, a reação acrossomal e a viabilidade, como demonstrado para a espécie bovina (Henricks *et al.*, 1998); para os suínos (Silva *et al.*, 2011), os búfalos (Selvaraju *et al.* 2010); e os equinos, com aumento da taxa de prenhez (Macpherson *et al.*, 2002). Já a insulina é uma proteína formada por duas cadeias ( $\alpha$  e  $\beta$ ), com 21 e 30 aminoácidos, que fornece energia ao espermatozoide, sendo liberada no ejaculado, com produção do NADPH, bem como influencia na capacitação espermática e no metabolismo autócrino (Andò e Aquila, 2005).

Nesse contexto, a adição da insulina e do IGF-I ao meio diluidor para congelamento de sêmen pode melhorar as condições metabólica e estrutural das células espermáticas após a criopreservação. Este estudo objetivou avaliar a influência da adição desses hormônios sobre os parâmetros das células espermáticas bovinas após a descongelamento.

## MATERIAL E MÉTODOS

As técnicas e os procedimentos utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade Estadual do Maranhão (Cetea – Uema, protocolo n°. 042/2014). O estudo foi realizado na Fazenda Soberana, município de Grajaú, MA (05°81'60" de latitude sul e 46°16'22" de longitude oeste, com 232 metros de altitude), que possui clima tropical, temperatura média de 28,5°C, precipitação anual média de 1240mm e umidade do ar de 62% (Estação..., 2014).

Foram utilizados seis touros da raça Nelore, com peso médio de 550kg ( $\pm$  45kg) e idade média de 72 meses ( $\pm$  seis meses), com histórico andrológico de aptidão reprodutiva. As coletas de sêmen foram realizadas por eletroejaculação, e as amostras foram levadas ao laboratório para as avaliações iniciais de motilidade, turbilhonamento, vigor e concentração espermáticos. Em seguida, o ejaculado foi diluído na proporção de 1:1 e mantido em banho-maria a 37°C, utilizando-se como solução diluidora o TRIS-gema/20%, com 7% de glicerol (Leite, 2008). Uma alíquota de sêmen de cada ejaculado foi separada em solução formol-salina para posterior avaliação da morfologia espermática, realizada em microscopia de contraste de fase, sob lâmina e lamínula, em aumento de 1000x. Foram contadas 200 células, e os resultados expressos em porcentagem, classificados em defeitos maiores e menores (Henry e Neves, 1998). A concentração de espermatozoides viáveis por palhetas de 0,25mL foi fixada em  $12 \times 10^6$ .

Foram instituídos quatro tratamentos: controle, insulina (100 $\mu$ UI/mL), IGF-I (150ng/mL) e insulina + IGF-I (50 $\mu$ UI/mL e 75ng/mL, respectivamente). O ejaculado de cada touro foi dividido entre eles, bloqueando o efeito do touro. Tais ejaculados foram separados em tubos tipo Falcon de 15mL, sendo diluídos para a concentração preconizada e acrescidos com os reagentes (insulina – Sigma I3536; IGF-I – Sigma I3769), de acordo com cada tratamento. Depois foram envasados.

Para a criopreservação do sêmen, foi utilizado o sistema programável portátil, modelo TK-3000<sup>®</sup>, usando a curva P1S2. As palhetas foram acondicionadas em porta-palhetas, seguindo a curva de refrigeração até se atingir 5°C. Quando foram alcançados os 5°C, manteve-se ali o sêmen em tempo de equilíbrio de duas horas. Em seguida, o porta-palhetas foi transferido para caixa térmica contendo nitrogênio líquido, onde permaneceu até a temperatura de -120°C, em uma curva de -15°C/minuto. Ao se chegar a essa temperatura, as palhetas foram retiradas do porta-palhetas e submersas no nitrogênio líquido a -196°C. As palhetas foram organizadas em raques e armazenadas em botijões criogênicos.

Ao término, as palhetas foram armazenadas em botijões com nitrogênio líquido, onde permaneceram até o momento da realização das análises pós-descongelamento (37°C/30 segundos), que foram: 1) análise morfológica (Henry e Neves, 1998); 2) teste de termorresistência rápido (46°C/30min; TTRr; Viana, 2004); 3) viabilidade espermática (mortos ou vivos) e acrossomal (com ou sem) pelo azul de tripan e Giemsa, observando-se quatro categorias: a) vivo com acrossoma intacto (VCA), b) morto com acrossoma intacto (MCA), c) vivo sem acrossoma (VSA) e d) morto sem acrossoma (MSA) (Silva, 1998); 4) análise computadorizada da motilidade espermática (CASA; Viana, 2004) e 5) integridade de membranas plasmática, acrossomal e de peça intermediária (função mitocondrial) com o uso de sondas fluorescentes, utilizando-se iodeto de propídio (IP; Sigma – 287075) e diacetato de 6-carboxifluoresceína (CFDA; Sigma – C5041), para a análise da membrana plasmática, iodeto de 5,5',6,6' – tetracloro 1,1',3,3' – tetraetilbenzimidazolo carbocianina (JC-1; Sigma – T4069), para a peça intermediária, e isocianato de fluoresceína com a lecitina *Arachis hypogaea* (FITC/PNA, Sigma – L7381), para a integridade do acrossoma do espermatozoide (Celeghini et al., 2007).

O delineamento foi em blocos ao acaso, ficando a variável TTR enquadrada como parcela subdividida (cada touro um bloco e o tempo do TTR, as subparcelas). As variáveis paramétricas

foram avaliadas pela ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Tukey. A função logarítmica foi utilizada para enquadrar a resposta dentro da normalidade. As variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Wilcoxon e Friedman, com significância de 5%. Todas as variáveis passaram pelos testes de normalidade de Shapiro-Wilk e Lilliefors. Utilizou-se o programa BioEstat 5.0 para comparação entre as médias.

## RESULTADOS

Todos os animais foram previamente classificados como aptos à reprodução (Henry e Neves, 1998), com o mínimo de 60% de motilidade e 70% de células espermáticas normais, não se sobressaindo mais de 5% de um mesmo defeito, tanto maior quanto menor, observado nas Tab. 1 e 2.

A Tab. 3 mostra os resultados do TTRr. Os dados foram analisados dentro de cada tratamento para avaliar a resposta nos diferentes tempos (zero, 10, 20 e 30min), os quais mostraram diferença ( $P < 0,05$ ), sem haver, no entanto, efeito ( $P > 0,05$ ) entre os tratamentos. Os dados de motilidade espermática mantiveram-se até 10 minutos do período de avaliação em todos os tratamentos, sobressaindo-se no tratamento com insulina isolada, a qual manteve seu valor inicial até o tempo de 20 minutos. A Tab. 4 apresenta os resultados de vivos e mortos, com e sem acrossoma, obtidos por meio da coloração com azul de tripan/Giemsa, segundo Silva (1998).

Tabela 1. Biometria testicular e análise subjetiva inicial do sêmen de seis touros Nelore que foram utilizados experimentalmente

	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 2. Análise da morfologia espermática de seis touros Nelore que foram utilizados experimentalmente

	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	---	---	---	---

Tabela 3. Média±EPM (%) dos resultados da motilidade espermática avaliada pelo teste de termorresistência rápida (TTRr) pós-descongelção

Tempo (min)	Controle (%)	Insulina (%)	IGF-I (%)	Insulina + IGF-I (%)
0	35,8±09,1a	34,0±11,0a	38,0±14,0a	38,0±14,0a
10	37,0±13,0a	35,0±18,4a	33,3±18,6ab	37,5±16,6ab
20	30,0±08,9b	22,5±16,0ab	25,0±08,3b	31,6±09,8b
30	16,6±13,6bc	15,8±12,8b	15,8±11,1bc	17,5±14,0bc

Letras minúsculas distintas na mesma coluna diferem (P<0,05) pelo teste de Wilcoxon. Não houve diferença (P>0,05) entre os tratamentos dentro do tempo.

Tabela 2. Média±EPM dos resultados do teste de azul de tripan e Giemsa pós-descongelção

	Sptz VCA (%)	Sptz VSA (%)	Sptz MCA (%)	Sptz MSA (%)
Controle	95,3±37,4	3,7±2,8	76,5±41,1	8,0±4,0
Insulina	95,0±44,2	4,1±2,1	78,3±48,1	7,1±9,4
IGF-I	94,5±42,6	3,7±1,7	74,0±55,3	15,0±7,1
Insulina + IGF-I	94,6±42,4	4,2±1,9	72,6±47,0	11,5±11,9

SPTZ: espermatozoide; VCA: vivo com acrossoma; VSA: vivo sem acrossoma; MCA: morto com acrossoma; MSA: morto sem acrossoma. IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina do tipo 1.

Nas categorias analisadas (VCA, VSA, MCA e MSA), os tratamentos instituídos não tiveram diferença (P>0,05) em relação ao grupo controle. Assim, agruparam-se os tratamentos dentro de cada categoria, havendo diferença (P<0,05) entre os resultados com e sem acrossoma, mas não (P>0,05) entre vivos e mortos: vivos com (94,87±7,96a) e sem acrossoma (19,91±3,99b) e mortos com (75,37±9,19a) e sem acrossoma

(10,41±1,77b). Nas análises pelo CASA, os resultados foram classificados em três variáveis: movimento, motilidade e velocidade espermáticos. Os dados são apresentados, respectivamente, nas Tab. 4, 5 e 6. Não houve diferença estatística (P>0,05) entre os tratamentos instituídos, comparando-os com o que foi observado no grupo controle.

Tabela 4. Média±EPM do movimento espermático analisado pelo sistema CASA pós-descongelção

	MP rápido (%)	MP lento (%)	MNP (%)	Estático (%)
Controle	4,0±2,7	7,1±5,8	19,1±12,6	69,6±20,0
Insulina	4,9±3,3	7,3±5,4	22,4±14,7	65,2±22,8
IGF-I	5,1±4,1	8,3±7,9	23,3±18,9	63,2±29,9
Insulina + IGF-I	3,6±3,0	5,7±4,6	20,5±14,0	70,1±21,3

MP: movimento progressivo; MNP: movimento não progressivo; IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I. As médias não diferiram ( $P>0,05$ ) pelo teste de Tukey, ANOVA.

Tabela 5. Média±EPM dos resultados da motilidade espermática feita pelo sistema CASA pós-descongelamento

	Estática (%)	Motilidade não progressiva (%)	Motilidade progressiva (%)
Controle	69,6±20,0	22,7±14,9	7,5±5,3
Insulina	69,2±22,8	25,5±17,6	9,2±6,2
IGF-I	63,2±29,9	27,8±24,2	8,9±6,8
Insulina + IGF-I	70,1±21,3	22,5±15,9	7,3±5,6

IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I. As médias não diferiram ( $P>0,05$ ) pelo teste de Tukey, ANOVA.

Tabela 6. Média±EPM dos resultados da velocidade espermática feita pelo sistema CASA pós-descongelamento

	Velocidade rápida ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	Velocidade media ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	Velocidade lenta ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )	Estático ( $\mu\text{m}/\text{seg}$ )
Controle	7,6±5,7	9,0±6,3	13,6±8,7	69,6±20,0
Insulina	7,9±6,2	10,9±7,8	15,8±9,2	65,2±22,8
IGF-I	9,6±8,8	12,1±12,1	15,0±9,7	63,2±29,9
Insulina + IGF-I	5,6±4,9	9,5±7,3	14,7±9,3	70,1±21,3

IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I. As médias não diferiram ( $P>0,05$ ) pelo teste de Tukey, ANOVA.

Pelas sondas fluorescentes, foram feitas análises das seguintes variáveis: integridade das membranas plasmática, acrossomal e de peça intermediária do espermatozoide; os resultados são apresentados na Tab. 7. Os tratamentos instituídos não provocaram efeito ( $P>0,05$ ) para as membranas plasmática e acrossomal, nem para a peça intermediária. Não houve diferença também dentro das

células ou das peças intermediárias intactas, assim como das que se apresentaram lesadas. Cabe observar, no entanto, que, na análise da membrana acrossomal, o valor obtido no tratamento insulina + IGF-I apresentou maior percentual de células íntegras. Apesar de não haver diferença estatística, observações clínicas devem ser consideradas.

Tabela 7. Média±EPM dos resultados da integridade das membranas plasmática, acrossoma e da peça intermediária dos espermatozoides, pós-descongelamento

	Membrana plasmática (%)		Acrossoma (%)		Peça intermediária (%)	
	Intacta	Lesada	Intacto	Lesado	Intacta	Lesada
Controle	51,5±21,5	48,5±21,5	66,0±18,1	34,0±18,1	16,0±9,5	84,0±9,5
Insulina	55,6±19,5	44,3±19,5	52,5±22,9	47,5±22,9	23,3±21,8	76,6±21,8
IGF-I	51,6±25,8	48,3±25,8	54,6±28,5	45,3±28,5	27,5±19,2	72,5±19,2
Insulina + IGF-I	40,3±17,9	59,6±17,9	73,5±10,2	26,5±10,2	26,8±24,7	73,1±24,7

IGF-I: fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I. As médias não diferiram ( $P>0,05$ ) pelo teste de Tukey, ANOVA.

## DISCUSSÃO

Dentro da argumentação andrológica de avaliação de touros, dois pontos se destacam quando se tenta prever a fertilidade de machos dessa espécie: a circunferência escrotal e as características do sêmen (Vale Filho, 1997). Uma vez que os animais alocados no experimento tinham média de idade de 72

meses, assim maduros, foram classificados como aptos à reprodução (Henry e Neves, 1998), corroborando o que foi apresentado por Pacheco *et al.* (2007), que, ao analisarem o efeito da idade sobre as características seminais e o perímetro escrotal, constataram que animais com essa média de idade não diferiram significativamente para as características morfológicas, estando as médias

dentro do padrão determinado pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (Henry e Neves, 1998).

No que diz respeito aos testes utilizados no experimento, trabalhos publicados atestam a eficiência deles na predição da viabilidade espermática. Entre eles, Emerick *et al.* (2011) citaram o TTR como sendo um teste sensível em relação à motilidade pós-criopreservação, que traz informação adicional na avaliação de sêmen bovino criopreservado. Tartaglione e Ritta (2004) trabalharam com o azul de tripan e Giemsa para avaliar a condição acrossomal de espermatozoides criopreservados de touros e observaram que esse 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 crioinjúrias. 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 espermáticas.

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

Neste estudo, não se observou diferença entre os tratamentos instituídos, podendo essa resposta ter sido oriunda das concentrações utilizadas de cada reagente dentro do meio diluidor de criopreservação. Era esperado maior número de células vivas com acrossoma, assim como maior concentração de células íntegras, tanto na membrana plasmática quanto na acrossomal, nos

tratamentos que incluíram insulina no seu meio, pois, segundo Aquila *et al.* (2005), a célula espermática mobiliza a insulina de seus grânulos no momento do processo de hiperativação. Esse mecanismo desencadeia maior aporte de energia para a célula espermática, o que, por sua vez, desestabiliza os componentes que mantêm a integridade das membranas plasmática e acrossomal antes da reação acrossômica. Tal percepção foi constatada, uma vez que os tratamentos envolvendo a insulina apresentaram maior número de células intactas. No entanto, sem confirmação estatística.

Seguindo esse pressuposto, esperava-se maior motilidade das células espermáticas que foram suplementadas com IGF-I. De acordo com Henricks *et al.* (1998), esse hormônio promove aumento da motilidade total e retilínea, uma vez que se liga aos seus receptores de membrana localizados nessas células. Contudo, deve-se ressaltar que o plasma seminal já contém tanto insulina quanto IGF-I no seu meio, justificando, assim, a comparação com o grupo controle. Esperava-se que a adição desses hormônios pudesse contrapor as argumentações de Aquila *et al.* (2005), que ressaltaram que a diluição seminal no meio de congelamento diminui as concentrações de insulina, deixando a célula espermática mais exposta às necessidades energéticas, requerendo, com isso, maior mobilização das suas reservas, o que, segundo o exposto anteriormente, levaria à maior desestabilização das membranas.

Esses resultados contrastam com os achados de Henricks *et al.* (1998), que identificaram a presença do IGF-I no plasma seminal de bovinos e destacaram uma relação positiva, mesmo que variável, desse hormônio com a morfologia e a motilidade espermáticas. No entanto, para Hoeflich *et al.* (1999), 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*, esse efeito deve ser reconsiderado nas condições *in vivo*, nas quais quantidades substanciais de proteínas ligadoras de IGF (IGFBP) estão presentes no plasma seminal bovino, e também em condição artificial, que pode modificar a meia-vida e as

interações dos receptores de IGF dos espermatozoides.

Apesar de concluir a relação positiva do IGF-I na morfologia e na motilidade espermáticas, até mesmo o trabalho de Henricks *et al.* (1998) atenta para o fato de que a biodisponibilidade do IGF-I, evento mediado pelas IGFBPs, sofre influência da presença, nas glândulas acessórias do trato reprodutivo, de um antígeno prostático capaz de clivar o IGF-I de suas proteínas de ligação, o que sugere que esse hormônio conjugado com suas proteínas só está biodisponível imediatamente antes ou após a ejaculação, constituindo esse um fator limitante à ação do IGF.

Hoeflich *et al.* (1999) corroboram acrescentando que a ação moduladora das IGFBPs sofre influência da concentração e do sítio de ação. Uma dessas proteínas carreadoras, 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. Também Miao *et al.* (1998) mostraram que a associação de IGF-I e IGFBP-3 ao meio de incubação não causou alteração estatística significativa nos parâmetros de motilidade espermática, diferentemente do que ocorria com o IGF-I isoladamente.

Hoeflich *et al.* (1999) mencionam ainda a ação das proteases como modificadoras das IGFBPs. 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 IGFBPs, representam um outro nível de controle regular da biodisponibilidade do IGF nos tecidos.

Quanto aos resultados observados sobre a insulina, não houve efeito benéfico; eles contrastam com os dados encontrados por van Tilburg (2006), que adicionou insulina em sêmen ovino criopreservado e concluiu que ela influenciou favoravelmente a motilidade, a cinemática e a integridade de acrossoma.

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), por meio da regulação da enzima G6PDH, tendo como resultado a produção de NADPH. Esse último vai agir nos eventos relacionados com a capacidade do espermatozoide de se fundir com o oócito.

O trabalho de Urner e Sakkas (1999) concluiu que o espermatozoide precisa gerar NADPH através da PPP, a fim de alcançar a fertilização. No entanto, a concentração dessa enzima NADPH precisa estar finamente equilibrada. A hiperatividade da via PPP pode danificar o espermatozoide, assim como a pouca estimulação pode tornar a célula espermática incapaz de fertilizar. Dessa forma, a insulina produzida pelo espermatozoide age 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 *et al.* (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 a insulina era o menos potente.

Selvaraju *et al.* (2009) referem-se também às concentrações de IGF-I capazes de manter a motilidade espermática superior à do grupo controle, citando a concentração de 100ng/mL. No presente estudo, foi utilizada a concentração de 150ng/mL de IGF-I isolado. No entanto, cabe destacar a 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 50µUI/mL e 75ng/mL, obteve, numericamente, o melhor resultado, deixando aqui abertura para novas pesquisas com novas dosagens.

## CONCLUSÃO

Nas condições utilizadas neste experimento, pode-se afirmar 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 foi lesiva nem favoreceu a motilidade das células espermáticas, bem como não aumentou a taxa de células espermáticas não capacitadas após a descongelação.

prenhez. *Cienc. Anim. Bras.*, v.12, p536-546, 2011.

## REFERÊNCIAS

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, p.1-6, 2005.

AQUILA S.; GENTILE M.; MIDDEA E. *et al.* Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. *Endocrinology*, v.146, 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.*, v.34, p.168-184, 2010.

BAILEY, J.L.; BILODEAU, J.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.*, v.21, p.1-7, 2000.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. *Reprod. Domest. Anim.*, v.42, p.479-488, 2007.

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, p.536-543, 2010.

EMERICK, L.L.; DIAS, J.C.; VALE FILHO, V.R. *et al.* Avaliação de integridade de membrana de espermatozoides bovinos criopreservados para prever o índice de

- ESTAÇÃO meteorológica de observação de superfície automática Grajaú-A207. INMET Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=estacoes/estacoesautomaticas>>. Acessado em: 12 out. 2014.
- 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. *Biol. Reprod.*, v.59, p.330-337, 1998.
- HENRY, M.; NEVES, J.P. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 52p.
- HOEFLICH, A.; REICHENBACH, H.D.; SCHWARTZ, J. *et al.* Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma. *Domest. Anim. Endocrinol.*, v.17, p.39-51, 1999.
- 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 Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.
- LUZ, V.B.; CHAVES, R.N.; ALVES, A.M.C. *et al.* Papel do fator de crescimento semelhante à Insulina – I (IGF-I) kit Ligand (KL) na função ovariana. *Acta Sci. Vet.*, v.43, p.1-10, 2015.
- 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 equine seminal plasma: association with sperm characteristics and fertility. *Biol. Reprod.*, v.67, p.648-654, 2002.
- 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. *Clin. Endocrinol.*, 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. *Int. J. Dev. Biol.*, v.43, 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, p.165-173, 2007.
- PARTYKA, A.; NIŻAŃSKI, W.; OCHOTA, M. Methods of assessment of cryopreserved semen. In: KATKOV, I. *Current frontiers in cryobiology*. London: Tech Open Access Publisher, 2012. p.547-574.
- PETERSON, A.J.; LEDGARD, A.M.; HODGKINSON, S.C. The proteolysis of insulin-like growth factor binding proteins in ovine uterine luminal fluid. *Reprod. Fertil. Dev.*, v.10, p.309-314, 1998.
- SELVARAJU, S.; NANDI, S.; SUBRAMI, T.S. *et al.* Improvement in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa functional parameters and fertility in vitro: effect of insulin-like growth factor-I. *Theriogenology*, v.73, p.1-10, 2010.
- 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. *Anim. Reprod. Sci.*, v.113, p.60-70, 2009.
- SILVA, A.E.D.F. *Reação acrossômica induzida: método indicador de fertilidade de touros*. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998, 38p. (Documento 35).
- SILVA, D.M.; ZANGERONIMO, M.G.; MURGAS, L.D.S. *et al.* Addition of IGF-I to storage-cooled boar semen and its effect on sperm quality. *Growth Horm. IGF Res.*, v.21, p.325-330, 2011.
- SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Sondas fluorescentes: um avanço na avaliação da integridade estrutural e funcional de espermatozoides. *Rev. Ciênc. Agrovet.*, v.11, p.162-169, 2012.
- TARTAGLIONE, C.M.; RITTA, M.N. Prognostic value of spermatoc parameters as predictors of in vitro fertility of frozen-thawed bull semen. *Theriogenology*, v.62, p.1245-1252, 2004.
- URNER, F.; SAKKAS, D. A possible role for the pentose phosphate pathway of spermatozoa

*Insulina e IGF-1...*

in gamete fusion in the mouse. *Biol. Reprod.*, v.60, p.733-739, 1999.

VALE FILHO, V.R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame de sêmen e classificação por pontos. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.21, p.7-13, 1997.

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, Rio de Janeiro, RJ.

VIANNA, F.P. *Eficiência dos testes de termoresistência (lento e rápido) em relação a fertilidade de sêmen congelado na espécie bovina*. 2004. Dissertação (Mestrado) –

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP.

WALTERS, E.M.; BENSON, D.J.; WOODS, E.J. *et al.* The history of sperm cryopreservation. In: PEACY, A.A.; TOMLINSON, M.J. *Sperm banking*. Theory and practice. Cambridge University, 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. *Biol. Reprod.*, v.70, p.632-639, 2004.