SÂMARA CRISTINE COSTA PINTO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO COM ADIÇÃO DE
INSULINA E FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À
INSULINA DO TIPO I (IGF-I) EM TOUROS DE BAIXA
CONGELABILIDADE**

São Paulo

2020

SÂMARA CRISTINE COSTA PINTO

**CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO COM ADIÇÃO DE INSULINA E
FATOR DE CRESCIMENTO SEMELHANTE À INSULINA DO TIPO I (IGF-I)
EM TOUROS DE BAIXA CONGELABILIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Reprodução Animal

Área de concentração:

Reprodução Animal

Orientadora:

Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho
Celeghini

De acordo: _____

Orientadora

São Paulo

2020

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3958
FMVZ

Pinto, Sâmara Cristine Costa
Criopreservação de sêmen bovino com adição de insulina e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) em touros de baixa congelabilidade / Sâmara Cristine Costa Pinto. – 2020.
117 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini.

1. Análises espermáticas. 2. Diluidor. 3. Fertilidade. 4. Touros. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Criopreservação de sêmen bovino com adição da insulina e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) em touros de baixa congelabilidade", protocolada sob o CEUA nº 2861160816 (ID 003375), sob a responsabilidade de **Eneiva Carla Carvalho Celeghini e equipe; Sâmara Cristine Costa Pinto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 15/03/2017.

We certify that the proposal "Semen cryopreservation with addition of insulin and insulin-like growth factor type I (IGF-I) in low freezability bulls", utilizing 374 Bovines (14 males and 360 females), protocol number CEUA 2861160816 (ID 003375), under the responsibility of **Eneiva Carla Carvalho Celeghini and team; Sâmara Cristine Costa Pinto** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 03/15/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2017** a **04/2018**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Prefeitura do Campus da USP de Pirassununga**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **30 a 34 meses**

N: **14**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **432 a 684 kg**

Origem: **Animais de proprietários**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **3 a 5 anos**

N: **360**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **400 a 500 kg**

Local do experimento: Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA/VRA) FMVZ- USP e em propriedades particulares para inseminação artificial e diagnóstico de prenhez.

São Paulo, 09 de agosto de 2018

Profa. Dra. Anneliese de Souza Traldi

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretária

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Universidade de São Paulo

São Paulo, 12 de fevereiro de 2020

CEUA N [2861160816](#)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Eneiva Carla Carvalho Celeghini

Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "Criopreservação de sêmen bovino com adição da insulina e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) em touros de baixa congelabilidade".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 005754)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 20/janeiro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Solicitamos aumento das informações sobre a taxa de prenhez de vacas submetidas à IATF (inseminação artificial em tempo fixo). Na proposta inicial seriam utilizadas as informações de resultados de IATF de 360 vacas; no entanto, será necessário o aumento do n amostral para aumentar o poder estatístico da pesquisa atual. Desta forma, o número total ideal para o estudo é de 1200 resultados de taxa de prenhez provenientes de IATF em vacas, o que gera o acréscimo de informações de 840 vacas em atividade reprodutiva, além das 360 já autorizadas. Vale ressaltar, que esses animais serão submetidos ao protocolo de IATF independente do projeto de pesquisa, procedimento zootécnico rotineiro nas propriedades, assim o estudo utilizará as informações de 1200 procedimentos para garantir melhores resultados e futuras publicações."

Comentário da CEUA: "".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PINTO, Sâmara Cristine Costa

Título: Criopreservação de sêmen bovino com adição de insulina e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) em touros de baixa congelabilidade

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais...

Minha mãe, Luciene Maria Costa

Meu pai, Roberto Tadeu Costa

A minha irmã, Aline Paulina P. Costa

E a Delânia Maria Almeida Rodrigues

Dedico com muito amor!

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me guiou por esse caminho, sem Ele não teria forças para ultrapassar as barreiras e com Ele foi possível chegar onde estou hoje.

Aos meus pais, Luciene e Roberto, por todo apoio, inspiração e entendimento. Por me ensinarem a ser forte, acreditar e insistir nos meus sonhos. À minha irmã Aline, que mesmo distante sempre trouxe palavras de conforto.

Ao Giovani, obrigada por sempre está perto e me ajudar em tudo, pelo amor, carinho e dedicação, muitas vezes deixando de fazer suas coisas em prol do nosso bem. Ao Milo e Anakin, meus cachorros, que trouxeram alegria e muita leveza.

À Alessandra Corallo Niccacio, meu especial agradecimento. Minha mãe da ciência, todos seus ensinamentos me inspiram em cada sonho dentro da academia, meu exemplo e quem sempre irei buscar em momentos de incertezas. Obrigada por acreditar sempre em mim, mesmo eu duvidando do que sou capaz. Minha gratidão!

Ao Prof. Dr. Fernando Andrade Souza, que é responsável pela minha evolução e sempre esteve presente nos momentos de dúvidas, aguçando sempre meu raciocínio e ajudando no meu crescimento profissional. Meu grande amigo, obrigada.

À Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho Celeghini, minha orientadora, por ter confiando e ter me dado oportunidade de entrar para seu grupo de pesquisa. Por ter contribuído na minha visão crítica e desenvolvimento científico. Além disso, pelo apoio e toda amizade durante esses anos todos.

Ao Prof. Dr. Rubens Paes de Arruda, que sempre esteve presente, passando seus conhecimentos e sempre buscando o melhor de cada um. Tenho uma honra imensurável por trabalhar ao seu lado e obrigada por ser sempre o exemplo dentro da reprodução.

Aos demais professores do Departamento de Reprodução Animal que contribuíram na minha formação Prof. Dr. Mário Binelli, Prof. Dr. Guilherme

Pugliesi, Prof Dr. André Furugen Cesar Andrade, Profa. Dra. Annelise de Souza Traldi, Prof. Dr. Ed Hoffmann Madureira, Profa. Dra. Mayra Elena Ortiz D'Ávila Assumpção, Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, Prof. Dr. Ricardo José Garcia Pereira, Prof. Dr. Marcílio Nichi, Profa. Dra. Claudia Barbosa Fernandes, Profa. Dra. Camila Infantsi Vannucchi, Profa. Dra. Clair Motos de Oliveira, Profa. Dra. Valquiria Hypolito Bernabe e Prof. Dr. Claudio Alvarenga Oliveira.

Ao grupo de pesquisa do LEPPaR, que ajudaram na execução dos experimentos, além de tornar o ambiente mais fácil e descontraído, meu Muito obrigada, pois sem vocês nada teria acontecido: Maíra Bianchi Rodrigues Alves, Shirley Andrea Florez Rodriguez, Flávia dos Santos Almeida, Leonardo Batissaco, Laura Nataly Garcia Oliveros, Vinicius José Moreira Nogueira, Vitor Hugo Guilguer Gonzaga, Gabriela Marques Rezende, Luísa Carneiro.

À Mariana Andrade e Marina Passarelli, pela ajuda nas infinitas leituras na microscopia e citometria de fluxo.

Aos colegas da pós-graduação Gilmar, Higor, Diego, Gabriela Zoca, Gabi, Felipe, Carol, Renata pela convivência no departamento e conversas durante o cafezinho. Em especial a Amanda, que me ajudou durante o experimento na Alta Genetics e a Patrícia por sempre me ouvir e ajudar em tudo.

À Alta Genetics, em especial aos Drs. Manoel Sá Filho, Neimar Severo e João Pedro, Pedro Monteiro, pela parceria e por ser possível utilizar os animais e o laboratório da empresa para realização dos experimentos. A todos os coletadores da Alta Genetics, representado pelo senhor Luiz, pela paciência e manejo com os touros utilizados nos experimentos. Aos técnicos de laboratório da Alta Genetics, Gabriel, Luiz, João, Solange e Rafael, pela prontidão e auxílio nas congelamentos dos experimentos.

À Fazenda Lajeado e todos os colaboradores, que executaram as inseminações.

Aos touros e as vacas, sem a colaboração deles nada disso seria possível.

À FAPESP, 2016/05395-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq, pelo apoio financeiro na concessão de auxílios de pesquisas e bolsa de estudo.

“Não importa o quão ruim a vida possa ser, há sempre alguma coisa que você pode fazer e ter sucesso. Enquanto há vida há esperança”

Stephen Hawking

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”

Chico Xavier

RESUMO

PINTO, S. C. C. **Criopreservação de sêmen bovino com adição de insulina e fator de crescimento semelhante à insulina do tipo I (IGF-I) em touros de baixa congelabilidade.** 2020. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

O objetivo do estudo foi avaliar os efeitos da adição de insulina e IGF-I no diluidor para criopreservação de sêmen bovino sobre as características espermáticas e fertilidade. Foram realizados dois estudos. No estudo 1, foi avaliada a adição de diferentes concentrações de insulina e IGF-I em diluidores comerciais (Botubov® e Triladyl®). Foram realizados dois experimentos, cada um foram utilizados três ejaculados de quatro touros (n=12). Cada ejaculado foi dividido em sete frações para a diluição nos seguintes tratamentos: CON: somente diluidor; IGF100: diluidor adicionado de IGF-I 100 ng/mL; IGF200: IGF-I 200 ng/mL; INS150: Insulina 150 µUI/mL; INS200: Insulina 200 µUI/mL; ASS1: IGF-I 100 ng/mL + Insulina 150 µUI/mL; ASS2: IGF-I 200 ng/mL + Insulina 200 µUI/mL. No experimento 1 o diluidor base foi o Botubov®, enquanto no experimento 2 foi o Triladyl®. O sêmen foi criopreservado por sistema automatizado. Em ambos os experimentos o sêmen foi avaliado pós-criopreservação quanto à motilidade espermática, integridade das membranas plasmática (H342 e PI) e acrossomal (FITC-PSA) e potencial de membrana mitocondrial (JC-1). As concentrações de 150 µUI/mL de insulina e de 100 ng/mL de IGF-I apresentaram os melhores resultados, sendo que INS150 preservou melhor as características espermáticas do que os grupos controle e IGF. No estudo 2, foi avaliado o impacto da suplementação de insulina e IGF-I em sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade sobre a qualidade espermática e taxa de prenhez. Foram realizados dois experimentos. No experimento 1, foram utilizados quatro ejaculados de 10 touros de alta (n=40) e de 10 touros de baixa (n=40) congelabilidade, que foram divididos em três frações, sendo acrescentados os tratamentos: Controle: somente diluidor Triladyl®; IGF: diluidor + IGF-I (100 ng/mL) e INS: diluidor + Insulina (150 µUI/mL). Pós-criopreservação, o sêmen foi avaliado quanto a motilidade (CASA), integridade de membrana plasmática (Live:Dead sperm Viability kit), integridade do acrossomo (FITC-PSA),

peroxidação lipídica (BODIPY) e estabilidade das membranas (Merocianina 540). Notou-se que a insulina preservou melhor motilidade subjetiva, total, progressiva, velocidade de trajeto, integridade das membranas plasmática e acrossomal, reduziu peroxidação lipídica e desordem das membranas, principalmente no sêmen de touros de baixa congelabilidade. No experimento 2, foi verificado o efeito da adição de insulina ao diluidor de criopreservação sobre a taxa de prenhez. Dois ejaculados de três touros de alta (n=6) e de três touros de baixa (n=6) congelabilidade foram utilizados. Cada ejaculado foi dividido em duas frações: Controle: somente diluidor Triladyl® e INS: diluidor Triladyl® adicionado de Insulina (150 µUI/mL). Foram submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) 1022 vacas, destas 509 receberam sêmen de alta congelabilidade, sendo 252 controles e 257 com insulina, e 513 receberam sêmen de baixa congelabilidade, sendo 261 controle e 252 com insulina. A taxa de prenhez não foi influenciada pela adição da insulina e nem pela congelabilidade do sêmen. Dessa forma, pode-se concluir que a insulina na concentração de 150 µUI/mL preserva a cinética espermática e integridade das membranas, diminui a peroxidação lipídica e aumenta a estabilidade das membranas; contudo não influencia na taxa de prenhez por IATF.

Palavra-Chave: Análises espermáticas. Diluidor. Fertilidade. Touros.

ABSTRACT

PINTO, S.C.C. **Cryopreservation of bovine semen with addition of insulin and type I insulin-like growth factor (IGF-I) in low freezability bulls.** 2020. 117 f. Tese (Doutorado em Ciências). Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

The aim of the study was to evaluate the effects of the addition of insulin and IGF-I to the semen extender for cryopreservation on bovine sperm characteristics and fertility. Two studies were carried out. In study 1, the addition of different concentrations of insulin and IGF-I in commercial extenders (Botubov® and Triladyl®) was evaluated. Two experiments were conducted, three ejaculates from four bulls were used (n = 12) in both experiments. Each ejaculate was divided into seven fractions for dilution in the following treatments: CON: only extender; IGF100: extender added IGF-I 100 ng/mL; IGF200: IGF-I 200 ng/mL; Ins150: Insulin 150 µUI/mL; Ins200: Insulin 200 µUI/mL; Ass1: IGF-I 100 ng/mL + Insulin 150 µUI/mL; Ass2: IGF-I 200 ng/mL + Insulin 200 µUI/mL. In experiment 1, the base extender was Botubov®, while in experiment 2, it was Triladyl®. The semen was frozen by an automated system. In both experiments, semen was evaluated post-cryopreservation for sperm motility, integrity of plasma (H342 and PI) and acrosomal (FITC-PSA) and mitochondrial membrane potential (JC-1). The concentrations of 150 µUI/mL insulin and 100 ng/mL IGF-I showed the best results, being the INS150 preserved better sperm characteristics than the control or IGF groups. In study 2, was evaluated the impact of insulin and IGF-I supplementation on semen of bulls with high and low freezability on sperm quality and pregnancy rates. Two studies were accomplished. In experiment 1, were used four ejaculates of 10 bulls of high freezability (n = 40) and 10 bulls of low (n = 40), which they were divided into three fractions, and added treatments: Control: only Triladyl® extender; IGF: Triladyl® extender added IGF-I (100 ng/mL) and INS: Triladyl® extender added Insulin (150 µUI/mL). Post-cryopreservation, semen was evaluated for motility (CASA), plasma membrane integrity (Live: Dead sperm Viability kit), acrosome integrity (FITC-PSA), lipid peroxidation (BODIPY) and membrane stability (Merocyanine 540). It was noted that insulin showed greater conservation of subjective, total, progressive motility, average path velocity, plasma and acrosomal membrane integrity, lower lipid peroxidation

index and less membrane disorder, especially in semen of bulls with low freezability. In experiment 2, the effect of adding insulin to the cryopreservation extender was verified on the pregnancy rate. Two ejaculates from three bulls of high freezability ($n = 6$) and three bulls of low ($n = 6$) were used. Each ejaculate was divided into two fractions and added treatments: Control: only Triladyl® extender and INS: Triladyl® extender added Insulin ($150 \mu\text{UI/mL}$). Cows were subjected to fixed-time artificial insemination (FTAI), 509 received semen with high freezability, being 252 controls and 257 with insulin, and 513 received semen with low freezability, being 261 control and 252 with insulin. The pregnancy rate was not influenced by the addition of insulin and was not different for cows receiving high or low semen freezability. Thus, it can be concluded that insulin at a concentration of $150 \mu\text{UI/mL}$ preserves sperm kinetics and membrane integrity, decreases lipid peroxidation and increases membrane stability; however, it does not influence the pregnancy rate by FTAI.

Keywords: Sperm analysis. Extender. Fertility. Bull.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Esquema experimental das vacas submetidas à IATF.....	76
Figura 2- Média ($\pm$ erro padrão) das características espermáticas da motilidade (subjetiva e CASA) para sêmen criopreservado de touros de alta e baixa congelabilidade nos diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina	78
Figura 3- Média ($\pm$ erro padrão) das características espermáticas da motilidade (CASA) para sêmen criopreservado de touros de alta e baixa congelabilidade nos diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina	80
Figura 4- Média ($\pm$ erro padrão) da membrana plasmática avaliadas pela citometria de fluxo para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade nos diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina	83
Figura 5- Média ($\pm$ erro padrão) da membrana acrossomal avaliadas pela citometria de fluxo para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade nos diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina	82
Figura 6- Média ($\pm$ erro padrão) da taxa de prenhez de fêmeas após a IATF utilizando sêmen criopreservado com insulina de touros de alta e baixa congelabilidade	88
Figura 7- Avaliação da membrana acrossomal utilizando iodeto de propídio por citometria de fluxo em sêmen criopreservado de touros	114
Figura 8- Avaliação da estabilidade da membrana utilizando Merocianina 540 por citometria de fluxo em sêmen criopreservado de touros.....	115
Figura 9- Avaliação da peroxidação lipídica utilizando C11 BODIPY® por citometria de fluxo em sêmen criopreservado de touros.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Médias ($\pm$ erro padrão) das características da motilidade espermática após a criopreservação utilizando Botubov [®] com diferentes concentrações de IGF-1 e Insulina.....	52
Tabela 2- Médias ($\pm$ erro padrão) das características da integridade de membranas após a criopreservação utilizando Botubov [®] com diferentes concentrações de IGF-1 e Insulina.....	54
Tabela 3- Médias ($\pm$ erro padrão) da motilidade espermática (MT), integridade da membrana plasmática (PI), acrossoma intacto (AI) e alto potencial de membrana mitocondrial (HP) após a criopreservação utilizando Triladyl com diferentes concentrações de IGF-1 e Insulina.....	56
Tabela 4- Parâmetros utilizados para separação dos animais em alta e baixa congelabilidade.....	67
Tabela 5- Média ($\pm$ erro padrão) das características espermáticas da motilidade avaliada pelo sistema CASA (VCL, VSL, STR, WOB, ALH e BCF) para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade tratados com diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina.....	81
Tabela 6- Média ($\pm$ erro padrão) para peroxidação lipídica e desordem da membrana plasmática avaliadas pelo citômetro de fluxo para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade tratados com diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina	84
Tabela 7- Média ($\pm$ erro padrão) para os parâmetros espermáticos (subjetiva, CASA) para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade tratados com insulina utilizados na IATF	86
Tabela 8- Média ($\pm$ erro padrão) para a integridade de membranas plasmáticas (PIAHP, IP, AI, HMP) para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade tratados com insulina utilizados na IATF.....	87

SUMÁRIO

1. Introdução.....	19
2. Capítulo 1: Revisão de Literatura.....	24
2.1 Criopreservação de sêmen.....	24
2.2 Alta e baixa congelabilidade de sêmen bovino.....	30
2.3 Efeitos de Insulina e IGF-I na qualidade espermática	35
2.3.1 Insulina	35
2.3.2 IGF-I	37
3. Capítulo 2: “Adição de diferentes concentrações de insulina e IGF-I ao diluidor a base de gema de ovo sobre a criopreservação de sêmen bovino”	42
3.1 Resumo	42
3.2 Introdução	43
3.3 Material e métodos	45
3.3.1 Local do estudo e período experimental	45
3.3.2 Experimento 1	46
3.3.2.1 Colheita e avaliação do sêmen pré-criopreservação.....	46
3.3.2.2 Grupos de tratamento e criopreservação do sêmen.....	46
3.3.2.3 Avaliação do Sêmen Pós-criopreservação.....	47
3.3.2.3.1 Avaliação da motilidade espermática	48
3.3.2.3.2 Avaliação das membranas espermáticas.....	48
3.3.3 Experimento 2.....	49
3.3.3.1 Colheita e avaliação do sêmen pré-criopreservação.....	49
3.3.3.2 Grupo de tratamento e criopreservação.....	49
3.3.3.3 Avaliação do Sêmen Pós-criopreservação.....	50
3.3.3.3.1 Avaliação da motilidade espermática.....	50
3.3.3.3.2 Avaliação das membranas espermáticas.....	50
3.4 Análise estatística.....	50
3.5 Resultados.....	51
3.5.1 Experimento 1	51
3.5.1.1 Características da motilidade.....	51
3.5.1.2 Membranas espermáticas	53
3.5.2 Experimento 2.....	55
3.5.2.1 Característica da motilidade espermática	55
3.5.2.2 Membranas espermáticas.....	55
3.6 Discussão	57
3.7 Conclusão.....	60
4. Capítulo 3“A adição de IGF-I e insulina ao diluidor melhora a qualidade espermática e a fertilidade de sêmen de touros de baixa congelabilidade?”.....	62
4.1 Resumo	62
4.2 Introdução	63
4.3 Material e métodos	65
4.3.1 Local do estudo e período experimental.....	65
4.3.2 Experimento 1	66
4.3.2.1 Animais e manejo nutricional	66
4.3.2.2 Colheita e avaliação do sêmen pré-criopreservação.....	67

4.3.2.3 Tratamento e criopreservação de sêmen.....	68
4.3.2.4 Avaliação do sêmen pós-criopreservação.....	68
4.3.2.4.1 Avaliação da motilidade espermática	69
4.3.2.4.2 Avaliação da membrana plasmática	69
4.3.2.4.3 Avaliação da membrana acrossomal	70
4.3.2.4.4 Estabilidade (fluidez) das membranas.....	70
4.3.2.4.5 Avaliação da Peroxidação lipídica	71
4.3.3 Experimento 2.....	71
4.3.3.1 Animais e manejo nutricional	71
4.3.3.2 Colheita e análise do sêmen pré-criopreservação.....	72
4.3.3.3 Tratamento e criopreservação de sêmen.....	72
4.3.3.4. Avaliação do sêmen pós-criopreservação	73
4.3.3.4.1 Avaliação da motilidade espermática	73
4.3.3.4.2 Avaliação das membranas espermáticas	74
4.3.3.5 Inseminação Artificial em tempo fixo	74
4.4 Análise estatística	76
4.5 Resultados.....	77
4.5.1 Experimento 1	77
4.5.1.1 Motilidade espermática.....	77
4.5.1.2 Membrana plasmática	82
4.5.1.3 Membrana acrossomal	83
4.5.1.4 Peroxidação lipídica e estabilidade das membranas.....	84
4.5.2 Experimento 2.....	85
4.5.2.1 Motilidade espermática	85
4.5.2.2 Membranas espermáticas	87
4.5.2.3 Taxa de prenhez	88
4.6 Discussão.....	89
4.7 Conclusão	93
Referências.....	94
Apêndice A	114
Apêndice B	115
Apêndice C	116
Apêndice D	117

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A população mundial vem em crescente aumento e a necessidade quanto à produção de alimentos é diretamente proporcional, motivando o avanço do agronegócio no Brasil, o qual tem expressiva participação na economia, representando cerca de 20% do Produto Interno Bruto (PIB) (CEPEA, 2019). A pecuária destaca-se, e é favorecida pela demanda internacional, fazendo o Brasil um dos maiores produtores de alimento do mundo. De janeiro a outubro de 2019, foram exportadas cerca de 1.463.922 toneladas de carne bovina, com receitas de US\$ 5,776 bilhões, crescimento de 9,9% e 7,5%, respectivamente quando comparado ao mesmo período do ano passado (ABIEC, 2019). Além disso, o país tem o segundo maior efetivo de bovinos, com aproximadamente 213.523.056 cabeças, correspondendo a 22% do plantel mundial (IBGE, 2019).

Apesar da situação favorável da pecuária brasileira, a eficiência e produtividade dependem de fatores genéticos e da fertilidade dos animais. Assim, as biotécnicas da reprodução merecem destaque, pois são capazes de promover multiplicação do material genético. Notoriamente, a inseminação artificial (IA) é uma das biotécnicas reprodutivas mais antigas e difundida em todo mundo, sendo uma tecnologia confiável para os pecuaristas e responsável pelo progresso do rebanho nacional em curto período (BARUSELLI et al., 2018). No Brasil 13% das fêmeas bovinas em idade reprodutiva são inseminadas e dessas 87% são por inseminação artificial em tempo fixo (IATF) (BARUSELLI, 2020). Com isso, houve um impulso na comercialização de doses de sêmen. Dados do relatório semestral da ASBIA (2017), mostram um crescimento nas vendas internas (+7,6%) e nas exportações de sêmen (+60,4%) no primeiro semestre do ano. Em 2018, cerca de 15.367.943 doses de sêmen foram vendidas apresentando aumento de 13,7% quando comparado com 2017 (BARUSELLI et al., 2019) e para melhorar a eficiência, a qualidade do sêmen é fundamental.

A criopreservação de sêmen é um processo que permite a manutenção das células espermáticas em temperaturas criogênicas por um longo prazo (TREULEN et al., 2018). Inúmeros estudos em diferentes espécies já foram feitos; entretanto, cerca de 50% dos espermatozoides pós-descongelção se

tornam imóveis e os que sobrevivem são comprometidos, acarretando diminuição na motilidade espermática e danos as membranas plasmáticas e acrossomal, culminando com a diminuição da capacidade fecundante desses espermatozoides. Diversos fatores podem afetar a sobrevivência do espermatozoide criopreservado, dentre eles há: os diluidores e suas composições, os crioprotetores, a curva utilizada durante o processo, efluxo de colesterol e fluxo de cálcio e sódio e a produção de espécies reativas de oxigênio dos espermatozoides mortos (LAYEK et al., 2016).

Em adição, sabe-se que a capacidade do sêmen para congelar, descongelar bem e manter os espermatozoides viáveis, é característico de cada animal e variável em relação a cada ejaculado (RYU et al., 2019), assim os reprodutores podem ser classificados como indivíduos de baixa e alta congelabilidade, independente de apresentarem boas características espermáticas no sêmen *in natura*. Alguns fatores podem justificar essa sensibilidade seminal de alguns animais à criopreservação, dentre eles a composição das membranas plasmáticas e do plasma seminal (GARCIA et al., 2011; ALVAREZ et al., 2008).

A membrana plasmática é uma das estruturas dos espermatozoides mais suscetível aos danos da criopreservação (Silva e Guerra, 2011), sendo que uma menor proporção de lipídios insaturados pode acarretar a menor criotolerância, como relatado em bovinos por Zorzetto (2016). Enquanto, o plasma seminal é uma secreção complexa das glândulas acessórias e testículos com variadas funções, tais como carreador do gameta masculino até o trato reprodutivo da fêmea, participante do processo de capacitação espermática e reação acrossomal (ARAÚJO, 2014). Os principais constituintes do plasma seminal são as proteínas, sendo consideradas moduladoras das funções espermáticas (LEAHY e GRAAF, 2012), sendo relacionadas com a resistência a danos as células espermáticas durante a criopreservação (TONIOLLI et al., 2017). Em bovinos, identificaram 8 proteínas no plasma seminal que se diferenciam em touros de alta e baixa congelabilidade (KILLIAN et al., 1993).

Diante do exposto, foi proposta a adição da insulina e do fator semelhante à Insulina do tipo I (IGF-I) ao diluidor com o intuito de preservar as características espermáticas durante a criopreservação e obter melhores respostas após a descongelação para sêmen de touros ditos como de baixa congelabilidade. A

insulina é uma proteína formada por duas cadeias (α e β), com 21 e 30 aminoácidos, excretada pelas células betas do pâncreas em resposta a diferentes estímulos, como glicose, arginina, sulfonilureia, embora fisiologicamente a glicose seja o principal determinante (ANDÒ e AQUILA, 2005). Seus efeitos fisiológicos são mediados pela ativação de dois receptores relacionados à tirosina quinase: receptor INS (INSR) e o fator de crescimento tipo I do tipo INS (IGF1R) (CAVALHEIRA et al., 2002). Para os espermatozoides, a insulina fornece energia, sendo liberada no ejaculado, com produção do NADPH, influenciando na capacitação espermática e metabolismo autócrino (ANDÒ e AQUILA, 2005). Em humanos, observou-se preservação da motilidade espermática, proteção antioxidante, diminuição da fragmentação de DNA para espermatozoide criopreservados com insulina (SHOKRI et al., 2019).

O IGF-I um peptídeo com ação mediada pelos receptores tirosina-quinase do tipo I (LUZ et al., 2015), componente do plasma seminal secretado pelas células de Leydig e Sertoli, tem função na espermatogênese e esteroidogênese, e sua produção é controlada pelas gonadotrofinas LH e FSH (KUMAR et al., 2019). Suas principais ações relatadas são: preservação da motilidade espermática, reação acrossomal, proteção das membranas plasmática e acrossomal, como demonstrado para as espécies bovina (HENRICKS et al., 1998); suína (SILVA et al., 2011), bubalina (SELVARAJU et al., 2016) e equina com aumento da taxa de prenhez (MACPHERSON et al., 2002).

Assim, devido ao benefício desses hormônios sobre as células espermáticas se justifica o presente estudo. Acredita-se que o acréscimo de insulina e do IGF-I irá melhorar as características do sêmen pós-descongelação como também preservar as características espermáticas de touros classificados como de baixa congelabilidade e aumentar a taxa de prenhez após a IATF. O presente estudo tem como objetivo avaliar o efeito da adição de insulina e do IGF-I aos diluidores utilizados na criopreservação de sêmen bovino sobre as características da motilidade, integridade de membranas, peroxidação lipídica, estabilidade de membranas e a fertilidade à campo nos programas que empregam a IATF. Para tanto, a presente tese foi dividida em dois estudos. O primeiro estudo, dissertado no capítulo 2, tem como objetivo comparar a eficiência de diferentes concentrações de insulina e do IGF-I adicionados aos diluidores comerciais, Botubov® e Triladyl®, ambos contendo gema de ovo,

utilizados para a criopreservação de sêmen bovino em relação a cinética dos espermatozoides e integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial pós-descongelação. O segundo estudo, presente no capítulo 3, tem como objetivo analisar o impacto da suplementação de insulina e do IGF-I em touros de alta e baixa congelabilidade utilizando o diluidor Triladyl® sobre as características da motilidade, integridade de membrana plasmática e acrossomal, índice de peroxidação lipídica, estabilidade das membranas e taxa de prenhez na IATF.

*Capítulo 1:
Revisão de Literatura*

2 REVISÃO DE LITERATURA

Na revisão de literatura foram compilados dados literários referente à criopreservação de sêmen, diferenças na congelabilidade do sêmen de touros, bem como os efeitos de Insulina e do IGF-I sobre os espermatozoides.

2.1 Criopreservação de sêmen

A preservação de sêmen foi iniciada por Smith e Polge em 1949, quando relataram o efeito protetor do glicerol na sobrevivência dos espermatozoides, após o processo de criopreservação de espermatozoides de várias espécies a -79°C (Brandão et al., 2006). Lovelock e Bishop (1959) em seus estudos, comprovaram o uso de dimetilsulfóxido como agente protetor. Os primeiros bezerros nascidos por essa técnica foram relatados por C. Polge e L. Rowson em 1952, onde os espermatozoides foram congelados em ampolas e mantido a -79°C . Para o estudo, foram inseminadas 38 vacas, das quais 30 engravidaram. Deste experimento, nasceram 27 bezerros saudáveis e o primeiro foi nomeado de Gelado (SZTEIN et al., 2018). Posteriormente, pesquisadores começaram a entender as crio injúrias causadas pela criopreservação de sêmen, como o choque frio e o efeito solução, eventos já observados por Mazur et. al. (1972).

A criopreservação de sêmen, por sua vez, compreende a busca pela suspensão do metabolismo espermático e a manutenção de suas características por um período longo e indeterminado, mantendo a capacidade fecundante dos espermatozoides (KOMMISRUUD et al., 1996). O avanço dessa biotécnica veio com a descoberta da gema de ovo em adição do glicerol como proteção ao processo de refrigeração e congelação dos espermatozoides, respectivamente (PHILLIPS e LARDY, 1940). Com o passar dos tempos, novas técnicas foram introduzidas no protocolo de criopreservação, a fim de estender as metodologias para as diversas espécies (SALAMON, 2000). A conservação do sêmen facilita o armazenamento e transporte para seu uso na inseminação artificial (IA) e outras tecnologias avançadas da reprodução (GROTTER et al., 2019).

O propósito da criopreservação é manter a funcionalidade dos espermatozoides após as etapas que envolvem a congelação do sêmen, tais como: refrigeração, desidratação celular, congelação e descongelação (MEDEIROS et al., 2002). Para uma correta criopreservação das células espermáticas é necessário a interação entre os diluidores e as etapas posteriores do processo, na tentativa de diminuir os danos, como: choque frio, desidratação e formação de cristais de gelo (JASKO, 1994; YOSHIDA, 2000).

Para o espermatozoide ser capaz de fecundar, ele deve permanecer progressivamente móvel, ser capaz de produzir energia sob a forma de ATP, manter a membrana plasmática e a integridade acrossomal e reter as enzimas necessárias para a penetração no oócito (LAYEK et al., 2016). Contudo, em média 40 a 50% dos espermatozoides não sobrevivem ao procedimento da criopreservação de sêmen, mesmo utilizando as modernas metodologias quando comparado ao número de células móveis e íntegras do sêmen fresco, geralmente os resultados obtidos são inferiores, indicando um fator comprometedor da congelação (WATSON, 2000).

Os danos celulares ocasionados durante a criopreservação ocorrem através de duas lesões distintas: estresse osmótico e a formação de cristais de gelo, descritos desde meados de 1972 por Mazur et al. A formação de gelo extracelular modifica o equilíbrio isotônico devido ao aumento da concentração de solutos dissolvidos no meio extracelular, a membrana celular é semipermeável, assim é formado um gradiente de concentração de soluto entre os espaços extracelular e intracelular, o que pode levar ao aumento de pressão no lado da solução que tem uma menor concentração de solutos. A diferença de pressão entre os espaços extracelular e intracelular desencadeia um fluxo de água da região menos concentrada em direção à região de maior concentração. Portanto, a consequência da formação de gelo extracelular é a saída da água do meio intracelular para o espaço extracelular, causando desidratação celular (GROTTER et al., 2019). Nesse processo de desidratação, a taxa de refrigeração não pode ser muito rápida, pois a célula não tem a capacidade de retirar a água de forma tão rápida e o restante formará os cristais de gelo, assim a curva de congelação deverá ser suficientemente lenta para correta desidratação, e rápida o bastante para evitar que as células espermáticas fiquem expostas por muito tempo às elevadas concentrações do soluto (SNOECK, 2003).

Eventos contrários também podem acontecer, denominados de efeito solução, caracterizado pela desidratação excessiva da célula, elevada concentração de solutos e modificação do pH (SILVA et al., 2011). Nessas circunstâncias, o volume celular é reduzido em resposta da osmolaridade, levando a compressão do conteúdo citoplasmático, em consequência podem ocorrer lesões na membrana e produzir alterações irreversíveis em sua permeabilidade, perda de lipídios, entre outras alterações (GROTTER et al., 2019).

A integridade da membrana plasmática parece ser o parâmetro espermático mais afetado pela criopreservação (ARRUDA et al., 2007). Celeghini et al. (2008) verificaram um percentual de 59 e 49,23% de membrana plasmática lesada após a criopreservação utilizando Bioxcell® e Botubov®. Esses danos podem ser ocasionados pela técnica utilizada durante o processo, como: mudança de temperatura, ação dos componentes presentes no diluidor e a descongelação (WATSON, 1995).

A composição e a capacidade de resposta das membranas espermáticas determinam, o grau de dano sofrido durante as diferentes velocidades na refrigeração, passagem da fase de transição lipídica e desequilíbrios iônicos, denominado de choque frio (GROTTER et al., 2019). O choque frio, por sua vez, define-se como o conjunto de alterações ocorridas nas células espermáticas submetidas a uma queda brusca de temperatura, durante esse período a água e solutos também congelam no meio extracelular, resultando na alteração da osmolaridade, levando a desidratação do espermatozoide. No intervalo de temperatura, de 20 a 5°C, ocorrem as principais alterações nas membranas, como ruptura e perda nos arranjos celulares. Neste intervalo, a membrana plasmática altera a composição de líquido para gel, acarretando a diminuição da motilidade e maior permeabilidade (WATSON, 2000). Quando os espermatozoides sofrem o choque frio eles apresentam diminuição do metabolismo, movimento circular fechado, perda da motilidade espermática acentuada, devido ao aumento de permeabilidade da membrana e aos danos acrossomais (LEMA, 2011).

As membranas mitocondriais também podem ser danificadas, resultando na condensação e perda de material. Quanto aos acrossomas também podem reagir durante a criopreservação, e íons de cálcio são liberados,

culminando com a reação acrossômica precocemente o que resulta na diminuição da taxa de fecundação (PERIS et al., 2004; SILVA e GADELLA, 2006).

Outro efeito oriundo do processo de criopreservação observado é a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS). As ROS são intermediários reativos do oxigênio que agem como segundos mensageiros dentro das células. No entanto, um desequilíbrio entre geração das ROS e dos sistemas de defesa pelos antioxidantes desencadeia o estresse oxidativo (INCALZA et al., 2018).

As membranas espermáticas possuem grandes quantidades de ácidos graxos insaturados, enquanto o citoplasma possui uma pequena quantidade de enzimas capaz de debelar a ação das ROS, resultando na peroxidação lipídica, alterações das proteínas, danos ao DNA e morte espermática (AGARWAL et al., 2018). As ROS são caracterizadas como todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, que possuem alta reatividade eletrônica e estabilidade, sua reação pode ocorrer com um número elevado de compostos que atuam como doadores ou receptores de elétrons (Agarwal et al., 2005). Entre os ROS destacam-se os ânions superóxido (O_2^-), peróxidos (H_2O_2) e radicais livres de hidroxila (OH), entre eles o mais reativo e prejudicial (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999).

A peroxidação lipídica ocorre quando as ROS abstraem um átomo de hidrogênio das cadeias de ácidos graxos insaturados, presentes em grandes quantidades nos espermatozoides (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1999). Ao iniciar, o carbono reage com o oxigênio, resultando no radical peroxil, tendo como função o sequestro de hidrogênio, levando a uma sequência de oxidação dos ácidos graxos presentes nas membranas (JIALAL e GRUNDY, 1992). Como os lipídios são responsáveis por manter a integridade das membranas celulares, a peroxidação extensa dos lipídios altera a composição, estrutura e dinâmica das membranas. Os peróxidos também são capazes de propagar novas gerações das ROS ou degradar-se em compostos reativos capazes de fragmentar o DNA e as proteínas (GASCHLER e STOCKWELL, 2017).

Além da peroxidação, durante a criopreservação de sêmen ocorrem mudanças na estrutura e na função espermática resultante da variação de temperatura e desidratação da célula ocasionando uma reorganização dos lipídios da membrana aumentando a permeabilidade a água, ao Ca^{2+} e aos

crioprotetores, sendo que o Ca^{2+} ativa a adenil-ciclase aumentando a cAMP e 1,2-diacylglicerol (DAG), além de perda de ácidos graxos e colesterol, eventos similares que ocorrem no processo de capacitação (NARESH e ATREJA, 2015), denominado de crio-capacitação. Em adição, danos moleculares também podem ocorrer no sêmen congelado, com a remoção do colesterol, reorganização de lipídios e proteínas na membrana plasmática, modificação na fluidez da membrana e permeabilidade do Ca^{+2} no espermatozoide (LIU, 2016). Além da fosforilação da proteína tirosina e a polimerização da actina, caracterizados como um dos principais mecanismos que ocorrem no espermatozoide durante a capacitação espermática (BREITBART, 2003).

Para evitar o choque frio, crioprotetores são utilizadas nos diluidores. Os crioprotetores podem ser classificados como: penetrantes e não penetrantes. Os penetrantes caracterizam-se por ter peso molecular baixo, agindo na desidratação eficiente da célula em baixas taxa de refrigeração, à exemplo: glicerol, dimetilsulfóxido, 1–2 propanodiol, etilenoglicol, propilenoglicol entre outros. São responsáveis por evitar a formação de cristais de gelo que comprometem a integridade da membrana interna durante as mudanças de temperatura. Enquanto, os não penetrantes (gema de ovo, glicose, frutose, sacarose, entre outros) apresentam-se com alto peso molecular, são mais eficazes quando se utiliza alta taxa de refrigeração, fazendo a extração da água intracelular pela diferença de osmolaridade, sem penetrar as células. Nos diluidores são utilizados, geralmente, os dois tipos de crioprotetores (BENSON et al., 2012).

Entre os crioprotetores penetrantes, o glicerol se destaca sendo o mais utilizado na criopreservação de espermátóides para as diversas espécies. O glicerol tem ação intracelular, apresentando baixo peso molecular, alta solubilidade e baixa toxicidade em concentrações adequadas. Seu efeito é atribuído a sua propriedade de ligação com a água, reduzindo a temperatura de congelação do meio intracelular, impedindo a formação dos cristais de gelo. Além disso atua aumentando o volume dos canais de solventes descongelados, dilui alta concentrações de sais e diminui a pressão osmótica do meio (BITTENCOUR et al., 2013). Dentro dos crioprotetores não penetrantes, a gema de ovo sobreleva-se. A ação protetora da gema de ovo ocorre de forma extracelular pela presença das lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e alto

peso molecular, sendo o componente de maior proporção na gema de ovo, cerca de 68% (WATSON, 1995; ANTON e GANDEMER, 1997). Tendo também como função a estabilização das membranas plasmáticas pela neutralização dos componentes deletérios existentes no plasma seminal (AURICH, 1997), além de preservar a motilidade espermática e a integridade do DNA (MANJUNATH et al., 2002; MOUSSA et al., 2002).

Para uma correta preservação do sêmen é necessário à interação entre os diluidores e os espermatozoides. Os diluidores empregados na preservação espermática, de forma geral, devem garantir proteção e manutenção das características espermáticas e equilibrar a osmolaridade (BITTENCOUR et al., 2013). Diversos diluidores para congelação de sêmen bovino vêm sendo testado e utilizados. Os mais usuais são os que na sua composição apresentam gema de ovo. A exemplo o Botubov® (Botupharma®) e o Triladyl® (Minitube®), usado no presente estudo. O Botubov® é constituído por açúcares, antioxidantes, aminoácidos, gema de ovo e glicerol, segundo o fabricante. E o Triladyl® é um diluidor comercial tendo como componentes o Tris, ácido cítrico, açúcar, glicerol, solução tampão e antibióticos (Tylosin, Gentamicina, estreptomicina e lincomicina) que são responsáveis pela proteção e manutenção da viabilidade dos espermatozoides após a criopreservação. Rseona et al. (2017), em trabalho com bovinos, ao compararem a eficácia dos meios diluidores Triladyl e Ham's F10 verificaram que as características do sêmen criopreservado nesses meios permanece viável após 72 horas. Em adição, estudo comprova que a diluição em Triladyl garante melhor proteção ao DNA em sêmen de touros (WATERHOUSE et al., 2010).

Para a criopreservação das células espermáticas emprega-se a técnica convencional ou automatizada. Almquist e Wiggins (1973) foram pioneiros na descrição da técnica automatizada. Atualmente, no mercado há inúmeros equipamentos que realizam o processo de congelação em diferentes protocolos, com objetivo de manter a viabilidade espermática pós-descongelação. O sistema automatizado utiliza sistema eletrônicos em que é possível programar vários tipos de curvas de refrigeração e congelação, assegurando a homogeneidade e padronização da curva utilizada, diferente do sistema convencional, geralmente, são usados equipamentos mais simples como caixa de isopor e ou geladeiras associado ao uso de nitrogênio líquido para realização das curvas positivas

(refrigeração) e negativas (congelamento) (FORERO-GONZALEZ et al., 2012). Um ritmo e constante é importante não apenas para se evitar o choque térmico nos espermatozoides, como também para a padronização das técnicas e obtenção de partidas mais homogêneas (LIMA et al., 2010). Abud et al (2014) compararam os dois sistemas de criopreservação em sêmen de touros e não verificaram diferenças estatísticas para as características espermáticas avaliadas entre as técnicas.

2.2 Alta e baixa congelabilidade de sêmen bovino

A congelabilidade do sêmen é um fator de extrema importância para o incremento do material biológico para a realização e sucesso da técnica de Inseminação Artificial e, conseqüentemente, para o Melhoramento Genético Animal (RONCOLLETTA et al., 1999). Contudo, a capacidade do sêmen para congelar e descongelar bem, é específico de cada animal (RONCOLETTA et al., 2013) assim os reprodutores podem ser classificados como indivíduos de alta e baixa congelabilidade, independente de apresentarem boas características espermáticas no sêmen *in natura*. Alguns fatores podem justificar essa sensibilidade seminal de alguns animais a criopreservação, dentre eles a composição das membranas plasmáticas, plasma seminal e mudanças moleculares (GARCIA et al., 2011; ALVAREZ et al., 2008; UGUR et al., 2020).

A membrana plasmática é uma das partes estruturais dos espermatozoides mais suscetíveis aos danos da criopreservação (SILVA e GUERRA, 2011). Durante a refrigeração ocorre a diminuição da temperatura e as restrições do movimento lateral dos fosfolípidios induzem uma mudança da fase líquida para a gel, fazendo com que a membrana se torne mais rígida e frágil. As mudanças de fase envolvendo as membranas lipídicas levam à separação dos lipídios, assim, as proteínas são agrupadas irreversivelmente (WATSON, 2000), desta maneira uma menor proporção de lipídios insaturados pode acarretar em menor crio tolerância, como relatado por Garcia et al. (2011) em equinos e em bovinos por Zorzetto (2016).

O plasma seminal é uma secreção complexa das glândulas acessórias sexuais, dos epidídimos e testículos com variadas funções, tais como carreador do gameta masculino até o trato reprodutivo da fêmea, participante do processo

de capacitação espermática e reação acrossomal (ARAÚJO, 2014). O principal constituinte são as proteínas as quais estão presentes na forma de complexos associados, com composição, conformação, tamanho e são espécie-específico (JELÍNKOVÁ et al., 2003), podendo permanecer no fluído seminal ou ainda se ligarem a membrana espermática durante a ejaculação com atividades biológicas diversas relacionadas à fecundação (SALVADOR e SALVADOR, 2019). As proteínas são consideradas moduladoras das funções espermáticas (LEAHY e GRAAF, 2012) exercendo importantes funções, desde a regulação, estabilidade, capacitação espermática e fertilidade (MUIÑO-BLANCO et al., 2008) sendo potentes marcadores moleculares.

Várias proteínas presentes no plasma seminal bovino têm influência direta na congelabilidade do sêmen. Estudos através da análise das proteínas por eletroforese unidimensional, observaram três polípeptídeos (45, 24 e 10,8 kDa) presente de forma mais expressiva nos reprodutores com melhor congelabilidade (RONCOLLETA, 1999a), e a proteína 24 kDa, prostaglandina D sintase tipo Lipocalina, está presente em maior quantidade em reprodutores com melhor congelabilidade (RONCOLETTA et al., 1999b).

As proteínas que se relaciona com o choque térmico têm um maior nível de expressão no sêmen com maior crio tolerância quando confrontado com os touros de menor crio tolerância, assim concentrações mais baixas da proteína de choque térmico no meio da congelação causam menor viabilidade espermática pós-descongelação, enquanto concentrações mais altas melhoram a integridade da membrana plasmática (UGUR et al., 2020).

Em ovinos 362 proteínas no plasma seminal foram identificadas, destas 75 estavam relacionadas ao grupo de melhor qualidade espermática após a descongelação e 48 estavam presentes em maior abundância nos animais com pobre qualidade espermática após o processo de criopreservação. No grupo de melhor qualidade, das 75 proteínas 8 delas estavam diretamente relacionadas à resistência ao choque térmico no grupo de pior resposta após a criopreservação, 6 delas estavam relacionadas ao processo de criopreservação (RICKARD et al., 2015).

A proteína ácida do fluído seminal bovino (aSFP), a clusterina, a albumina e a osteopontina (OPN), foram as proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a alta congelabilidade do sêmen; sendo indicadas como

marcadores (JOBIM et al., 2009). O aSFP de 12,9 kDa é uma proteína não glicosilada ácida (EINSPANIER et al., 1994), sintetizada principalmente pelo epitélio da ampola e da vesícula seminal do touro em altas concentrações (2-7 mg/mL EINSPANIER et al., 1994; DOSTÀLOVÀ et al., 1994) e foi descrita no líquido epididimal (MOURA et al., 2010). Essa proteína não foi detectada em nenhum outro tecido bovino nem em outras espécies de mamíferos, como cabras, ovelhas, porcos, ratos, cães ou humanos (WEMPE et al., 1992; EINSPANIER et al., 1994). Uma das características desta proteína é liga-se à superfície do espermatozoide ejaculado e, para que ocorra a fecundação *in vitro*, é necessário a liberação desta proteína da membrana espermática. Isto sugere que a aSFP atua como fator decapacitante do espermatozoide bovino (DOSTÀLOVÀ et al., 1994). Segundo Schöneck et al. (1996) a aSFP pode ser responsável pela preservação da membrana, possuindo um efeito antioxidante na peroxidação lipídica da membrana da célula espermática *in vitro*. Reafirmando, Bustamante-Filho et al. (2014) afirma que a aSFP é responsável pela tolerância ao processo de criopreservação de sêmen.

A clusterina é uma proteína de peso molecular de 25,35 kDa, responsável pela regulação, transporte e redistribuição de lipídios no plasma sanguíneo humano (JENNE et al., 1991), estando presente no fígado, cérebro e testículo bovino (PALMER e CHRISTIE, 1992), além disso se pode encontrá-la no plasma seminal, bem como na superfície da membrana da célula espermática do bovino e do homem (HOWES et al., 1998). A clusterina está envolvida em vários processos fisiológicos, incluindo adesão e agregação celular (BLASCHUK et al., 1983) e maturação espermática (SYLVESTER et al., 1991). Em estudo com 63 humanos iranianos, verificou-se que o nível de clusterina no líquido seminal dos pacientes férteis foi de $48,3 \pm 38,6$ ng/mL e nos inférteis foi de $15,5 \pm 9,7$ ng/mL, sendo a clusterina considerada um marcador para avaliação rápida da qualidade do sêmen em estudos de infertilidade masculina (SALEHI et al., 2013).

A albumina tem cerca de 66 kDa, foi imunoidentificada, no experimento com reprodutores e apresentou densidade óptica superior nas amostras dos reprodutores de alta congelabilidade do sêmen, e isso pode ser explicado devido à capacidade da albumina em participar de modificações de permeabilidade da membrana espermática (JOBIM et al., 2002). Enquanto a osteopontina é caracterizada como uma glicoproteína que pode ser isolada na matriz óssea

bovina, cartilagens, pele nos fetos, cérebro, rins, ovário, útero, urina, bile, leite bovino (KERR et al., 1991; SORENSEN e PETERSEN, 1994) e nos ejaculados de touros (ERICKSON et al., 2007).

A osteopontina é uma glicofosfoproteína altamente fosforilada, possui aproximadamente 314 aminoácidos com peso molecular variando entre 44 e 75 kDa (ICER e GEZMEN-KARADAG, 2018). Em reprodutores taurinos, observaram que a proteína osteopontina é considerada um dos marcadores de alta fertilidade existentes no plasma seminal (KILLIAN et al., 1993). Jobim et al. (2002) verificaram que esta proteína apresentou densidades ópticas significativamente superior nas amostras de plasma seminal de reprodutores de alta congelabilidade de sêmen, independentemente da subespécie a que pertenciam. A relação da osteopontina e a congelabilidade pode ser elucidada através da sua adesão celular pelos receptores celulares da família da integrina, assim modulando as funções celulares da membrana plasmática dos espermatozoides, garantindo a proteção durante o processo de criopreservação. E touros com alta fertilidade vão apresentar 4 vezes mais osteopontina no plasma seminal quando comparado com touros de baixa fertilidade (MOURA et al., 2006).

Além dessas, existem as proteínas de ligação (BSP) que também se relaciona com a congelabilidade. As BSP representam, aproximadamente 60% do conteúdo total das proteínas presentes no plasma seminal, sendo encontradas com maior abundância as BSP A1/A2, BSP A3, BSP-30-kDa (MANJUNATH et al., 2009). As principais funções dessa proteína são: interação com os fosfolipídios colina da membrana espermática promovendo a capacitação (THERIEN et al., 2005); mediação da ligação do sêmen ao epitélio nos oviduto (GWATHMEY et al., 2006; SUAREZ, 2016); melhoram as taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário quando adicionados ao sêmen de epidídimo de bovinos *in vitro* (RODRIGUEZ-VILLAMIL et al., 2016); melhoram a motilidade espermática após o processo de criopreservação em bovino e ativam a ATPase ligada à membrana (MENEZES et al., 2017).

Durante a criopreservação foi observada diminuição significativa (70-80%) na concentração das proteínas BSP ligadas à membrana espermática, o que indica modificações na membrana do espermatozoide, durante a congelação, as quais podem alterar as propriedades da membrana, levando à capacitação

prematura do espermatozoide após a descongelação (NAUC e MANJUNATH, 2000). Estudo com sêmen bovino, verificaram as diferenças da congelabilidade entre os animais, evidenciando que reprodutores de alta congelabilidade apresentam maior densidade óptica da BSP 1, conferindo maior preservação das propriedades da membrana espermática durante o processo da congelação do sêmen (JOBIM et al., 2004) e que a BSP 1 é capaz de estabilizar os estresses ocorridos durante a criopreservação via ativação e/ou aprimoramento da atividade Ca^{2+} -ATPase (SANCHEZ-LUENGO et al., 2004; MENEZES et al., 2017).

Atualmente a motilidade espermática e a integridade das membranas são consideradas importante preditores da fertilidade e da congelabilidade (YOON et al., 2015). Esses parâmetros são afetados pela formação de cristais de gelo devido à alta fluidez das membranas (OBEROI et al., 2014). RYU et al. (2019) verificou que touros de alta congelabilidade apresentavam maior valores para as características de motilidade, para os parâmetros de velocidade espermática, para integridade de membranas e o potencial da membrana mitocondrial após a congelação, sendo assim que o grupo com alta congelabilidade pode manter mais facilmente sua motilidade e integridade das membranas do que um grupo com baixa congelabilidade, assim cada touro tem uma tolerância diferente a congelação dos espermatozoides.

Além da motilidade espermática e integridade das membranas, a integridade do DNA e a estrutura da cromatina foram identificados como os fatores cruciais na capacidade do esperma de suportar o processo de criopreservação e apoiar o desenvolvimento embrionário, onde a criopreservação e descongelação do sêmen afeta o DNA tornando-o vulnerável e suscetível a modificações moleculares e epigenéticas, que afetam o desenvolvimento embrionário (UGUR et al., 2019).

Os danos ao DNA podem estar relacionados a diversos mecanismos que acontecem durante a criopreservação, tais como: aumento do nível das espécies reativas de oxigênio, que essas por sua vez, podem quebrar a fita dupla do DNA; comprometimento das enzimas responsáveis pelo reparo do DNA e compactação da cromatina devido ao encolhimento celular (McCARTHY et al., 2009). Em adição, durante a criopreservação a quantidade de RNA espermático pode ser facilmente alterada e os criodanos podem degradar os mRNAs e assim

interromper a função das proteínas relacionadas a fertilidade (GIARETTA et al., 2017; KASHIR et al., 2001; WANG et al., 2014).

2.3 Efeitos de insulina e IGF-I sobre a qualidade espermática

2.3.1 Insulina

A insulina é uma proteína formada por duas cadeias (α e β), com 21 e 30 aminoácidos respectivamente, conectadas por duas pontes dissulfeto, não é espécie-específica, derivada da pró-insulina, um hormônio peptídico de cadeia única com um peso molecular de 9.388 Da, sendo produzida principalmente pelas células β do pâncreas (THEVIS et al., 2010). A secreção da insulina na corrente sanguínea é regulada principalmente pela glicose (PROKS e LIPPIAT, 2006).

Após a secreção da insulina pelas células pancreáticas, a insulina circula pela corrente sanguínea, com meia vida aproximadamente de 12 minutos (THEVIS et al., 2010). Seu efeito é via ligação com os receptores IRs, sinalizando por meio de proteínas quinases ativadas e fosfoinositol-3 quinase (CARPINO et al., 2010). A ação principal consiste no controle da glicose no sangue, sendo responsável também pela síntese de proteínas e lipídios e o aumento das funções intracelulares e da membrana plasmática (YOUNIS et al., 1998). Tem efeito pleiotrópico (CARPINO et al., 2010), importante para a promoção e regulação do crescimento, diferenciação e metabolismo celular e diferenciação na função gonadal (AQUILA et al., 2005), como também atua na translocação do GLUT-4 (o transportador de glicose) das vesículas intracelulares para a membrana celular e, portanto, aumenta a taxa de entrada de glicose para uma dada concentração no tecido alvo (THEVIS et al., 2010).

Ademais, 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. A insulina está presente no plasma seminal de bovinos, como demonstrado por Souza et al. (2012) que determinaram o perfil da leptina e insulina de touros da raça Gir, de

acordo com seus achados a insulina está relacionada com qualidade estrutural dos espermatozoides, com concentração média de $31,08 \pm 18,58$ U/mL para o grupo de animais com maior porcentagem de defeitos graves em comparação com animais com menor porcentagem desses defeitos espermáticos, que apresentaram concentração média de $40,01 \pm 25,37$ U/mL.

Estudos demonstram que o espermatozoide tem a capacidade autônoma de liberar insulina por meio de um circuito de alça curta autócrina, assim, o espermatozoide 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. A insulina liberada autorregula a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), enzima limitante na via da pentose fosfato (PPP), que tem se mostrado ser essencial na aquisição da capacidade fecundante e na motilidade espermática e fusão dos gametas (AQUILA et al., 2005 E ANDÒ E AQUILA, 2005).

A insulina nos espermatozoides não-capacitados, pode ser localizada ao nível subacrossomal, na peça intermediária e por toda a extensão do flagelo. Em meio onde a capacitação é estimulada, os espermatozoides secretam significativamente mais insulina do que em meio não-capacitante (AQUILA et al., 2005).

Além da proteção às membranas, sabe-se que a insulina atua no metabolismo do espermatozoide (VAN TILBURG et al., 2008). A motilidade espermática é um processo dependente da produção de ATP, sendo que as enzimas glicolíticas presente na bainha fibrosa dos flagelos são uma das principais fornecedoras de energia, além das mitocôndrias pela fosforilação que estão localizadas na peça intermediária dos espermatozoides (TAKEI et al., 2014). A energia é importante para a manutenção da motilidade, para capacitação e subsequente fecundação do oócito, sendo que a energia é produzida através da metabolização dos substratos externos (DING et al., 2015). Moléculas pequenas como os monossacarídeos atravessam facilmente a bicamada da membrana plasmática dos espermatozoides, as demais moléculas recebem auxílio das proteínas de membranas que podem transportar ativamente

ou passivamente a glicose (DING et al., 2015) e a presença da insulina é essencial para o deslocamento da glicose pela membrana plasmática.

Em homens com diabetes mellitus apresentam aumento nos defeitos estruturais graves, motilidade e concentração espermática significativamente menor, bem como aumento das patologias nos espermatozoides quando comparado a homens saudáveis (BACCETTI et al., 2002). Mais tarde, outro estudo realizado com homens diabéticos confirmaram a diminuição do volume seminal e porcentagem de células móveis, sugerindo que a insuficiência de insulina pode influenciar nas características funcionais dos espermatozoides (PERGIALIOTIS et al., 2016).

Estudo recente em humanos, demonstraram um efeito protetor da adição da insulina ao diluente, com diminuição da fragmentação do DNA, diminuição do estresse oxidativo e preservação da motilidade espermática após o processo de criopreservação de sêmen (SHOKRI et al., 2019). Em adição, Lampião et al. (2008) demonstraram a resposta da insulina *in vitro* em relação a função espermática e comprovaram que esse hormônio melhora a capacidade de fecundação dos espermatozoides de humanos.

Outros estudos, afirmam que a insulina preserva a integridade do acrossoma, através do mecanismo que ocorre em alguns tipos celulares, como nas células hepáticas, onde a insulina inibe a ligação do AMPc a proteína quinase e, conseqüentemente, a sua ativação, assim a insulina diminui a afinidade da proteína quinase com o AMPc, diminuindo a atividade capacitante dos espermatozoides (VAN TILBURG et al., 2008) e por ela estimular a síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídeos, e por aumentar as funções intracelulares e da membrana plasmática, pode melhorar a sobrevivência espermática após a congelação e descongelação (YOUNIS et al., 1998).

2.3.2 IGF-I

O IGF-I foi identificado pela primeira vez em 1957 pelos pesquisadores Salmon e Daughaday, sendo primeiramente chamado de “fator de sulfatação” devido sua capacidade de estimular a incorporação de sulfato na cartilagem de ratos. Mais tarde, em meados de 1972 o termo fator de sulfatação foi substituído para somatomedina, apontando ser uma substância sob controle e mediando os

efeitos do hormônio do crescimento (HG). E em 1976, em suas pesquisas Rinderknecht e Humbel, isolaram duas substâncias no soro de humanos que devido à sua semelhança estrutural com a pró-insulina foi renomeado como "fator de crescimento semelhante à insulina 1 e 2- IGF-I e II (LARON, 2001).

O fator de crescimento semelhante à Insulina do tipo I (IGF-I) também conhecido como somatomedina C, é um peptídeo promotor do crescimento que está relacionado com o crescimento e tamanho dos animais, e essa relação pode ser devida ao efeito mitogênico do IGF-I. A atividade mitogênica é modulada pelas proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) que têm um papel na manutenção de concentrações estáveis, na regulação da depuração e no transporte do IGF-I do soro para o tecido alvo (LEE et al., 2016). O IGF-I pertence a um complexo sistema formado por dois receptores de superfície celular (R1 e R2), seis proteínas de ligação (IGFBP1 a IGFBP6) e as proteases degradantes (KUMAR e LAXMI, 2015). Nos humanos, quase 80% do IGF-I circulante é transportado por IGFBP-3, um complexo ternário que consiste em uma molécula de IGF-I, uma molécula de IGFBP-3 e uma molécula denominada de subunidade lábil ácida com 88 kDa (LARON, 2001). Os receptores são compostos por duas subunidades extracelular α e duas subunidades β de 135 kDa e 90 kDa, respectivamente. Cada subunidade α é ligada a uma subunidade β por uma ponte dissulfídica, formando um α - β hemirreceptor que se liga a outro hemirreceptor por ponte dissulfídica entre as subunidades α , dando origem ao receptor completo sendo responsável por mediar a maioria das ações do IGF-I (JUNIOR-MARTINELLI et al., 2008).

Hormônio anabólico, o IGF-I tem alta similaridade com a Insulina (KUMAR e LAXMI, 2015), é produzido pelo fígado e tem efeito sobre vários tipos celulares regulando o metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. A maior parte do IGF-I circulatório é liberada do fígado, onde os hepatócitos produzem cerca de 75% do IGF circulante (YAKAR et al., 2012) em resposta ao hormônio do crescimento (HG), e tem efeito de feedback negativo na hipófise para regular a secreção do HG (KUMAR e LAXMI, 2015). O IGF-I bovino é um polípeptídeo básico de cadeia simples com 70 aminoácidos com massa molecular de 7649 Da e o cDNA bovino é 93% idêntico à sequência humana e a de aminoácidos é 96% idêntica à do humano. Três pontes de dissulfeto mantêm a estrutura terciária da molécula (WATSON et al., 1999).

Em adição, o IGF-I desempenha um papel importante em diferentes eventos reprodutivos. Nas fêmeas, estudos demonstram que o IGF-I juntamente com a insulina aumentam a ação das gonadotrofinas no controle da esteroidogênese ovariana e na maturação folicular e participa na seleção do folículo dominante, subsequente desenvolvimento no folículo de Graaf, bem como nos processos de ovulação, formação de corpos lúteos, e atresia (SANTIAGO et al., 2005). Nos machos, é produzido nos testículos e secretado pelas células de Leydig e Sertoli (LEE et al., 2016), sendo sua produção controlada pelas gonadotrofinas FSH e LH (LEJEUNE et al., 1996), e a falta dessa substância no testículo pode induzir infertilidade (GNESSI et al., 1997). Sua atuação é através dos receptores produzindo seus efeitos por várias vias, incluindo fosfatidil-inositol 3 quinase (PI3K), Akt e pela via da proteína quinase ativada-MAPK (KUMAR; LAXMI, 2015). Na maioria das espécies, estão envolvidos na diferenciação e função das células de Leydig, na esteroidogênese aumentando os receptores das gonadotrofinas, na expressão das principais enzimas esteroidegênicas e como fator importante na espermatogênese (HENRICKS et al., 1998).

A concentração do IGF-I no plasma seminal de bovinos tem valor médio de 116-144 ng/mL (HENRICKS et al., 1998), no sêmen de equinos cerca de 10,3 ng/mL (MACPHERSON et al., 2002), suínos de 1,39–2,44 ng/mL (ZANGERONIMO et al., 2013), coelhos média de 200 ng/mL (BIELOHUBY et al., 2014). Os receptores do IGF-I foram localizados nas espermatogônias, espermatócitos, espermatídes e espermatozoides (HENRICKS et al., 1998), assim esse hormônio pode ser um fator importante para desenvolvimento, maturação e ativação da motilidade (VICKERS et al., 1999). A ativação da motilidade é atribuída ao IGF-I presente no plasma seminal e sua interação com a região acrossomal, via receptores presentes no acrossoma (HENRICKS et al., 1998). Fundamentando, estudo em búfalos, verificaram que o IGF-I atua como um ativador metabólico dos espermatozoides que está envolvido no movimento celular (motilidade e intensidade de movimento), aumentando o metabolismo dos carboidratos, e consequentemente, a capacidade fertilizante dos espermatozoides (SELVARAJU et al., 2010). Alguns estudos demonstraram que a adição do IGF-I melhora a qualidade espermática em homens (MIAO et al., 1998), equinos (MACPHERSON et al., 2002; CHAMPION et al., 2002), cães

(SANG-MIN et al., 2014), búfalos (SELVARAJU et al., 2010, 2016; KUMAR et al., 2019), carneiros (PADILHA et al., 2012), suínos (SILVA et al., 2011b), IAQUE (Pan et al., 2015) e bovinos (HENRICKS et al., 1998).

CAPÍTULO 2:

Adição de diferentes concentrações de insulina e IGF-I ao diluidor a base de gema de ovo sobre a criopreservação de sêmen bovino

3. ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INSULINA E IGF-I AO DILUIDOR A BASE DE GEMA DE OVO SOBRE A CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN BOVINO

3.1 Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações de insulina e IGF-I a diluidores à base de gema de ovo (Botubov® e Triladyl®) para a criopreservação de sêmen bovino sobre a cinética dos espermatozoides e integridade de membranas e potencial mitocondrial. Para tanto, foram realizados dois experimentos, em cada um foram utilizados três ejaculados de quatro touros (n=12). Cada ejaculado foi dividido em sete frações iguais (30×10^6 spz/mL) para a diluição nos seguintes tratamentos: CON: somente diluidor; IGF100: IGF-I 100 ng/mL; IGF200: IGF-I 200 ng/mL; INS150: Insulina 150 µUI/mL; INS200: Insulina 200 µUI/mL; ASS1: IGF-I 100 ng/mL + Insulina 150 µUI/mL; ASS2: IGF-I 200 ng/mL + Insulina 200 µUI/mL. O sêmen foi criopreservado por sistema automatizado. Duas palhetas de cada tratamento foram descongeladas (37°C/30 segundos) e avaliadas quanto à motilidade espermática, integridade das membranas plasmática (H342 e PI) e acrossomal (FITC-PSA) e potencial de membrana mitocondrial (JC-1). Para o diluidor Botubov®, o INS150 foi mais eficiente na preservação da motilidade total, progressiva, velocidade curvilínea (VCL) e frequência de batimento (BCF), bem como para integridade de membranas e potencial mitocondrial do que os outros tratamentos. Resposta similar foi encontrada quando estes aditivos foram adicionados ao Triladyl®, ou seja, INS150 mostrou-se mais eficiente em preservar a motilidade espermática em relação aos demais grupos, bem como na preservação das membranas e potencial mitocondrial em relação ao IGF-I e aos grupos associados. Conclui-se que a adição de insulina, na concentração de 150 µUI/mL, contribui para melhorar a qualidade pós-criopreservação do sêmen bovino nos diluidores à base de gema de ovo.

Palavras-chaves: Espermatozoides, Congelação, Botubov, Triladyl, Touros

3.2 Introdução

O crescimento demasiado da população mundial está provocando expressivo aumento na demanda por alimentos, originando apreensão no setor pecuário na produção de alimentos de origem animal que possa atender o crescente número de habitantes no mundo (FAO, 2017). Nessa perspectiva, o Brasil apresenta vantagens, devido a sua extensão territorial, condições favoráveis de clima e por ter um dos maiores efetivos bovinos do mundo, com aproximadamente 213 milhões de cabeças, garantido assim como um dos maiores produtores de alimento (IBGE, 2019). Dessa forma, é necessário o desenvolvimento de técnicas capazes de promover multiplicação do material genético, entre estas as biotécnicas aplicadas à reprodução merecem destaque (BARUSELLI et al., 2019). A Inseminação artificial é uma das biotécnicas reprodutivas mais antiga e difundida em todo mundo, sendo confiável para os pecuaristas e responsável pelo progresso do rebanho nacional em curto período e controle de doenças venéreas (BARUSELLI et al., 2018), sua eficiência é dependente da qualidade do sêmen criopreservado utilizado.

A criopreservação de sêmen é um processo que permite a manutenção das células espermáticas em temperaturas criogênicas por um longo prazo (TREULEN et al., 2018). Notório que o processo de congelação e descongelação do sêmen resulta em alterações irreversíveis sobre as membranas espermáticas e as características do movimento dos espermatozoides, bem como sobre a integridade do DNA (CELEGHINI et al., 2008; AMIDI et al., 2016). Estas alterações refletem diretamente na fertilidade do sêmen criopreservado (OLIVEIRA et al., 2014). Os danos celulares ocasionados durante a criopreservação podem estar relacionados ao estresse osmótico, a formação de cristais de gelo intracelular, produção de espécies reativas de oxigênio ou o conjunto desses danos de forma simultânea nas células espermáticas (GROTTER et al., 2019).

Desta forma, a capacidade fecundante dos espermatozoides criopreservados é dependente da preservação da integridade e funcionalidade das estruturas espermáticas, garantida pelos componentes presentes nos diluidores, sendo os principais constituintes as substâncias iônicas e não iônicas, as quais são responsáveis pela osmolaridade e tamponamento, entre estas substâncias

estão as lipoproteínas de alto peso molecular, presentes na gema de ovo, que são cruciais para evitar o choque frio; os crioprotetores intracelulares, tais como glicerol; as fontes energéticas, representadas pelos açúcares, glicose e frutose; e os demais aditivos (OLIVEIRA et al., 2018).

Dentre os diluidores comerciais utilizados na criopreservação de sêmen de bovinos, destacam-se Triladyl® e Botubov®. O Triladyl® é um diluidor concentrado contendo: açúcares, TRIS (Hidroximetil), ácido cítrico, tampões, antibióticos, gema de ovo, glicerol e água (Minitube®); enquanto, o Botubov® possui em sua composição: açúcares, antioxidantes, aminoácidos, gema de ovo, glicerol e água (Botupharma®, Botucatu-SP).

Para minimizar os efeitos deletérios da criopreservação de sêmen vários aditivos são estudados na tentativa de garantir melhor preservação das células espermáticas, como em bovinos (PINTO et al., 2020), cães (DALMAZZO et al., 2018), carneiro (BANDAY et al., 2017) e humanos (BERKOVITZ et al., 2018). Diante disso, foi proposta a utilização de insulina e do IGF-I.

A Insulina é uma proteína formada por duas cadeias (α e β), com 21 e 30 aminoácidos, que fornece energia ao espermatozoide, sendo liberada no ejaculado, com produção do NADPH, influenciando na capacitação espermática e metabolismo autócrino (ANDÓ e AQUILA, 2005). Os espermatozoides liberam insulina no ejaculado de forma autócrina, que autorregula a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), enzima limitante na via da pentose fosfato (PPP), que tem se mostrado ser essencial na aquisição da capacidade fecundante, na motilidade espermática e na mediação da fusão dos gametas (ANDO e AQUILA, 2005; AQUILA et al., 2005). Estudos com adição de insulina aos meios de criopreservação demonstram preservação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do metabolismo das células espermática (VAN TILBURG et al., 2008), diminuição na fragmentação de DNA (SHOKRI et al., 2019) e aumento na capacidade fecundante (LAMPIÃO e PLESSIS, 2008).

O IGF-I é um peptídeo similar à Insulina, componente do plasma seminal secretado pelas células de Leydig e Sertoli, sendo essencial na espermatogênese e esteroidogênese (LEE et al., 2016). Além disso, preserva a motilidade espermática, integridade das membranas plasmáticas e acrossomal, como demonstrado para as espécies bovina (HENRICKS et al., 1998); suína

(SILVA et al., 2011), bubalina (SELVARAJU et al, 2016) e equina com aumento da taxa de prenhez (MACPHERSON et al., 2002).

Apesar da literatura indicar que a suplementação dos hormônios, IGF-I e insulina, aos diluidores de criopreservação de sêmen bovino pode melhorar o metabolismo e preservar as estruturas das células espermáticas, os relatos ainda não definiram as concentrações. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar a adição de diferentes concentrações de IGF-I e insulina a diluidores à base de gema de ovo (Botubov® e TriladyI®) para a criopreservação de sêmen bovino sobre a cinética dos espermatozoides e integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial mitocondrial.

3.3 Material e Métodos

3.3.1 Local do estudo e período experimental

O presente estudo foi realizado com quatro touros da raça Nelore, com idade de 2 a 3 anos, com peso médio de $921,25 \pm 78,46$ kg, mantidos em piquetes com pastagem de capim Braquiária, sal e água *ad libitum* e suplementação concentrada diária, de acordo com as exigências nutricionais indicadas para a categoria e idade seguindo o NRC (2016). Os animais foram pesados a cada 15 dias e antes do início do experimento foi realizado o controle de endo e ectoparasitas.

Os experimentos foram conduzidos no Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no Campus Fernando Costa em Pirassununga-SP, sendo as análises realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia e no Laboratório de Andrologia e Transferência de Embriões Suínos.

O período experimental foi de novembro de 2017 a janeiro de 2018 (experimento 1) e de março a abril de 2018 (experimento 2). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo-USP/Brasil, protocolo CEUA número 2861160816.

3.3.2 *Experimento 1: Adição de diferentes concentrações de Insulina e IGF-I ao diluidor Botubov® sobre a criopreservação de sêmen de touros Nelore*

3.3.2.1 Colheita e avaliação do sêmen pré-criopreservação

Foram utilizados três ejaculados de quatro touros (n=12). O sêmen foi colhido, por eletroejaculação (Autojac, Neovet®, Uberaba/SP/Brasil), em tubo graduado de 15 mL. Imediatamente após a colheita foi mantido em banho-maria a 37°C durante a avaliação. Cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume, concentração, motilidade, vigor espermáticos e morfologia espermática.

O volume do sêmen foi determinado pelo tubo graduado utilizado durante a colheita. A concentração espermática foi determinada em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica em aumento de 400x, após a diluição na proporção de 1:100 em solução de formol salino tamponado a 4%. A motilidade espermática e o vigor espermático foram avaliados, com uma gota do sêmen entre lâmina e lamínula, sob microscopia óptica (Nikon, Eclipse E200) em aumento de 100x, sendo a motilidade estimada em porcentagem de espermatozoides móveis e o vigor espermático em escore de 1 a 5, segundo o preconizado para a espécie bovina de acordo com o CBRA (2013). A morfologia espermática foi realizada sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC, Nikon, Eclipse 80i), entre lâmina e lamínula em aumento de 1000x. Foram contadas 200 células e os resultados expressos em porcentagem, classificados em defeitos maiores e menores, segundo Blom (1973).

3.3.2.2 Grupos de tratamento e criopreservação do sêmen

Após a colheita, cada ejaculado foi dividido em sete frações iguais todas diluídas para concentração final na palheta de 30×10^6 sptz/totais em diluidor Botubov® (Botupharma®, Botucatu-SP) adicionado de diferentes concentrações de IGF-I (Sigma-Aldrich, I3760) e insulina (Sigma-Aldrich, I2643), para a distribuição nos grupos: **Controle**: somente diluidor Botubov® (**BCON**); **BIGF100**: Botubov® acrescido de 100 ng/mL de IGF-I; **BIGF200**: Botubov acrescido de 200 ng/mL de IGF-I; **BINS150**: Botubov acrescido de 150 µUI/mL de Insulina; **BINS200**: Botubov acrescido de 200 µUI/mL de Insulina; **BASS1**:

Botubov acrescido de 100 ng/mL de IGF-I + 150 μ UI/mL de Insulina; **BASS2:** Botubov acrescido de 200 ng/mL de IGF-I + 200 μ UI/mL de Insulina.

Para a definição das concentrações a serem utilizadas de IGF-I e insulina nos grupos, foram consideradas as concentrações basais médias desses hormônios no plasma seminal (HENRICKS et al., 1998; ANDÓ e AQUILA et al., 2005).

O sêmen diluído e suplementado com as diferentes concentrações dos hormônios, foi incubado por 10 minutos a 37°C para a interação entre o sêmen e o diluidor. Em seguida, foram envasados em palhetas francesas de 0,25 mL, sendo estas identificadas com número do animal, partida e tratamento. A criopreservação de sêmen foi realizada em sistema automático (Tetakon, TK 3000 Plus®, Uberaba/MG/Brasil). Para a congelação, utilizou-se a curva de 0,25°C/minutos até atingir 5°C, permanecendo por 30 minutos para estabilização. Após, o porta-palheta foi transferido para a caixa térmica contendo nitrogênio líquido até a temperatura de -120°C, em uma curva de -20°C/minuto. Ao chegar a essa temperatura as palhetas foram submersas em nitrogênio líquido a -196°C. Ao final, as palhetas, segundo cada tratamento e animal foram organizadas em racks e armazenadas em botijão criogênico.

3.3 2.3 Avaliação do sêmen pós-criopreservação

3.3.2.3.1 Avaliação motilidade espermática

As características do movimento espermático foram avaliadas pelo sistema computadorizado de análise espermática - CASA (SCA® - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha). O setup foi ajustado previamente para avaliação de espermatozoides de bovinos. Duas palhetas de cada partida e tratamento foram descongeladas em banho-maria por 30 segundo a 37°C colocadas em microtubos e homogeneizadas. Para a realização das análises, as amostras foram diluídas para concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL em meio *TALP sperm* (Bavister e Lorraine, 1983). A amostra de sêmen diluído foi colocada na câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) para avaliação. As características investigadas foram: motilidade total (MT, %),

motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), oscilação do trajeto real (WOB, %) deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

3.3.2.3.2 Avaliação das membranas espermáticas

Para avaliar as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, 150 μL do sêmen diluído em meio TALP sperm (Bavister e Lorraine, 1983), na concentração de 10×10^6 espermatozoide/mL, foi depositado em um microtubo e adicionados 2 μL de Hoechst 33342 (H342, 0,5 mg/mL, Molecular Probes, H1399), 2 μL de Iodeto de propídeo (PI, 0,5 mg/mL em DPBS, Molecular Probes, P3566), 6 μL de Iodeto de tetracloro – tetraetilbenzimidazonilcarbonianina (JC-1, 153 μM em DMSO, Molecular Probes, T3168) e 20 μL de *Pisum sativum* aglutinina (FITC-PSA, 100 $\mu\text{g/mL}$ em DPBS, Botubov acrescido). As amostras foram incubadas por 8 minutos a 37°C. Após a incubação, uma gota (4 μL) desta foi colocada entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37°C) e a leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380nm e emissão 435-485nm), B-2E/C (excitação 465-495nm e emissão 515-555nm) e G-2E/C (excitação 540-525nm e emissão 605-655nm), com aumento de 1.000x. Foram contadas 200 células, classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme Celeghini et al. (2008), e os resultados expressos em porcentagem. Desta avaliação foram considerados os percentuais de integridade de membrana plasmática (IP), integridade de acrossoma (IA) e potencial de membrana mitocondrial (HMP), bem como foi considerado o percentual de espermatozoides apresentando simultaneamente integridade das membranas plasmática acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIHP).

3.3.3 *Experimento 2: Adição de diferentes concentrações de Insulina e IGF-I ao diluidor Triladyl® sobre a criopreservação de sêmen de touros Nelore*

3.3.3.1 Colheita e avaliação do sêmen pré-criopreservação

Para este experimento também foram utilizados três ejaculados de quatro touros (n=12). As colheitas foram realizadas por eletroejaculação (Autojac, Neovet®, Uberaba/SP/Brasil) e as avaliações realizadas como descrito no experimento 1.

3.3.3.2 Grupos de tratamento e criopreservação do sêmen

Após a colheita, cada ejaculado foi dividido em sete frações iguais e diluídos para concentração final na palheta de 30×10^6 sptz/totais em diluidor Triladyl® (Preparado segundo fabricante; Minitube®), sendo adicionadas as mesmas concentrações utilizadas no experimento 1 de IGF-I e insulina, sendo que os grupos de tratamento consistiram em: **Controle**: somente diluidor Triladyl® (TCO); **TIGF100**: diluidor Triladyl® acrescido de 100ng/mL de IGF-I; **TIGF200**: diluidor Triladyl® acrescido de 200 ng/mL de IGF-I; **TINS150**: diluidor Triladyl® acrescido de 150 μ UI/mL de Insulina; **TINS200**: diluidor Triladyl® acrescido de 200 μ UI/mL de Insulina; **TASS1**: diluidor Triladyl® acrescido de 100 ng/mL de IGF-I + 150 μ UI/mL de Insulina; **TASS2**: diluidor Triladyl® acrescido de 200 ng/mL de IGF-I + 200 μ UI/mL de Insulina.

O sêmen diluído e suplementado com as diferentes concentrações dos hormônios, permaneceram por 10 minutos incubados a 37°C para a interação sêmen/tratamento. Em seguida, foram envasados em palhetas francesas de 0,25 mL, sendo estas identificadas com número do animal, partida e tratamento. O processo de criopreservação de sêmen utilizado foi o mesmo descrito no experimento 1.

3.3.3.3. Avaliação do sêmen pós-criopreservação

3.2.3.3.1 Avaliação motilidade espermática

Para motilidade espermática foram descongeladas duas palhetas de cada partida em banho-maria a 37°C por 30 segundos, homogeneizadas em microtubo, sendo que 4 µL de sêmen foram depositados entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas) para leitura por microscopia de contraste de fase (Nikon, Modelo Eclipse 80i) em aumento de 100x, estimada em porcentagem, segundo o preconizado para espécie bovino pelo CBRA (2013).

3.3.3.3.2 Avaliação das membranas espermáticas

Para avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o mesmo protocolo descrito no experimento 1. Foram contadas 200 células, classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme descrito por Celeghini et al. (2008). Foram considerados os percentuais de integridade de membrana plasmática (IP), integridade de acrossoma (IA) e potencial de membrana mitocondrial (HMP), bem como foi considerado o percentual de espermatozoides apresentando simultaneamente integridade das membranas plasmática acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIHP).

3.4 Análise estatística

O delineamento estatístico utilizado nos dois experimentos foi em blocos ao acaso, sendo as variáveis paramétricas testadas por ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Tukey. Todas as variáveis foram testadas quanto à normalidade pelo Lilliefors. As variáveis que tinham respostas subjetivas ou não apresentaram distribuição normal após transformação linear foram analisadas como não paramétricas, comparando-se os ranqueamentos pelo teste de Friedman. O intervalo de confiança utilizado foi de 95%. Os dados foram analisados pelo programa BioEstat 5.0.

3.5 Resultados

3.5.1 *Experimento 1: Adição de diferentes concentrações de Insulina e IGF-I ao diluidor Botubov® sobre a criopreservação de sêmen de touros Nelore*

3.5.1.1 Características da motilidade espermática

Em relação às características avaliadas pelo CASA (Tabela 1), foi possível observar que a adição de 150 µUI/mL de Insulina (BINS150) ao diluidor Botubov® melhorou a preservação da motilidade total em relação ao grupo controle e aos outros aditivos ($p \leq 0.01$). Em adição, o grupo BINS150 apresentou o maior percentual da motilidade progressiva, quando comparado aos grupos BIGF100 ($p \leq 0.01$), BIGF200 ($p \leq 0.01$), BINS200 ($p \leq 0.05$), BASS1 e BASS2 ($p \leq 0.01$); no entanto, foi semelhante ao grupo controle. O grupo BINS150 apresentou maior VCL quando comparado aos demais grupos ($p \leq 0.05$). A VSL do grupo BINS150 foi maior em relação ao BIGF200 ($p \leq 0.05$), não diferindo dos demais grupos. O ALH espermático foi maior no grupo BINS150 em comparação aos demais grupos ($p \leq 0.05$). Os maiores valores de BCF foi observado para os grupos BCON, BINS150, BINS200 e BASS1. Somente o BIGF200 apresentou BCF inferior ao BCON ($p \leq 0.05$); enquanto BINS150 foi superior aos grupos BIGF100 ($p \leq 0.01$), BIGF200 ($p \leq 0.01$) e BASS2 ($p \leq 0.05$); além disso BASS1 foi maior que BIGF200 ($p \leq 0.05$). No entanto, para as características VAP, LIN, STR e WOB não houve efeito da suplementação das diferentes concentrações de BIGF-I e insulina utilizando o diluidor Botubov.

Tabela 1- Médias ($\pm$ erro padrão) das características da motilidade espermática após a criopreservação utilizando Botubov[®] com diferentes concentrações de IGF-1 e Insulina

Parâmetros	BCON	BIGF100	BIGF200	BINS150	BINS200	BASS1	BASS2	p
MT (%)	52.57 $\pm$ 3.23 ^b	38.93 $\pm$ 3.62 ^c	37.98 $\pm$ 7.33 ^c	65.93 $\pm$ 4.14 ^a	51.17 $\pm$ 3.33 ^b	44.70 $\pm$ 7.09 ^c	38.40 $\pm$ 6.56 ^c	< 0.0001
MP (%)	43.30 $\pm$ 2.41 ^{ab}	31.49 $\pm$ 4.11 ^c	31.14 $\pm$ 7.29 ^c	52.02 $\pm$ 3.92 ^a	40.57 $\pm$ 4.55 ^{bc}	37.36 $\pm$ 6.78 ^{bc}	31.54 $\pm$ 5.98 ^c	< 0.0001
VCL (μ m/s)	127.75 $\pm$ 7.77 ^b	134.18 $\pm$ 12.62 ^b	124.51 $\pm$ 10.01 ^b	152.16 $\pm$ 10.19 ^a	132.39 $\pm$ 11.26 ^b	135.42 $\pm$ 13.32 ^b	129 $\pm$ 10.49 ^b	$\leq$ 0.05
VSL (μ m/s)	86.43 $\pm$ 8.02	82.79 $\pm$ 5.92	77.74 $\pm$ 7.39	89.72 $\pm$ 8.14	81.07 $\pm$ 7.28	84.74 $\pm$ 7.75	80.77 $\pm$ 5.98	$\geq$ 0.05
VAP (μ m/s)	99.68 $\pm$ 9.20	95.94 $\pm$ 7.55	89.98 $\pm$ 8.23	98.23 $\pm$ 9.85	94.88 $\pm$ 8.62	97.25 $\pm$ 8.61	93.18 $\pm$ 6.57	$\geq$ 0.05
LIN (%)	62.42 $\pm$ 2.07	62.51 $\pm$ 3.26	62.39 $\pm$ 3.26	62.73 $\pm$ 2.83	61.22 $\pm$ 2.48	63.10 $\pm$ 2.49	63.50 $\pm$ 1.92	$\geq$ 0.05
STR (%)	84.49 $\pm$ 2.96	85.83 $\pm$ 1.26	83.21 $\pm$ 4.20	85.74 $\pm$ 3.42	82.71 $\pm$ 2.61	84.92 $\pm$ 3.15	84.37 $\pm$ 3.19	$\geq$ 0.05
WOB (%)	71.95 $\pm$ 1.67	72.28 $\pm$ 2.54	72.14 $\pm$ 2.70	72.47 $\pm$ 1.92	71.54 $\pm$ 1.70	72.18 $\pm$ 2.08	73.08 $\pm$ 1.76	$\geq$ 0.05
ALH (μ m)	2.44 $\pm$ 0.10 ^b	2.43 $\pm$ 0.20 ^b	2.21 $\pm$ 0.16 ^b	2.81 $\pm$ 0.16 ^a	2.40 $\pm$ 0.14 ^b	2.42 $\pm$ 0.18 ^b	2.36 $\pm$ 0.18 ^b	$\leq$ 0.05
BCF (Hz)	22.89 $\pm$ 0.97 ^{ab}	21.64 $\pm$ 1.14 ^{bc}	21.01 $\pm$ 1.17 ^c	23.60 $\pm$ 1.14 ^a	22.46 $\pm$ 0.87 ^{abc}	22.85 $\pm$ 1.17 ^{ab}	22.0 $\pm$ 1.15 ^{bc}	< 0.0001

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Letras sobrescritas na mesma linha diferem significativamente ($P \leq 0.05$).

Legenda: BCON (controle): sêmen adicionado somente do diluidor Botubov[®]; BIGF100: diluidor Botubov[®] acrescido de 100ng/mL de IGF-I; BIGF200: diluidor Botubov[®] acrescido de 200 ng/mL de IGF-I; BINS150: diluidor Botubov[®] acrescido de 150 μ UI/mL de Insulina; BINS200: diluidor Botubov[®] acrescido de 200 μ UI/mL de Insulina; BASS1: diluidor Botubov[®] acrescido de 100 ng/mL de IGF-I + 150 μ UI/mL de Insulina; BASS2: diluidor Botubov[®] acrescido de 200 ng/mL de IGF-I + 200 μ UI/mL de Insulina. MT= motilidade total; MP= motilidade progressiva; VCL= velocidade curvilínea; VSL= velocidade progressiva; VAP= velocidade do trajeto; LIN= linearidade; STR= retilinearidade; WOB= oscilação do caminho real; ALH= amplitude lateral da cabeça; BCF= frequência de batimento flagelar.

3. 5.1.2 Membranas espermáticas

Como pode ser notado na Tabela 02, a adição de insulina (BINS150 e BINS200) foi benéfica na preservação da integridade da membrana plasmática pós-criopreservação; contudo, somente a concentração de 150 μ UI/mL de insulina foi superior aos grupos controle e com outros aditivos. Por outro lado, não foi observado efeito da suplementação das diferentes concentrações de IGF-I e insulina ao diluidor sobre a criopreservação do sêmen para integridade do acrossomo e potencial de membrana mitocondrial ($p > 0.05$). Quando avaliada a população de espermatozoides com membrana plasmática intacta, acrossomo intacto e com alto potencial mitocondrial (PIAIHP), observou-se que o tratamento BINS150 foi mais eficiente para a preservação das membranas quando comparado aos demais grupos ($p \leq 0.05$).

Tabela 2- Médias ($\pm$ erro padrão) das características da integridade de membranas após a criopreservação utilizando Botubov[®] com diferentes concentrações de IGF-1 e Insulina

Parâmetros	BCON	BIGF100	BIGF200	BINS150	BINS200	BASS1	BASS2	p
PI (%)	38.00 $\pm$ 4.40 ^b	32.87 $\pm$ 2.35 ^b	32.29 $\pm$ 4.41 ^b	54.00 $\pm$ 3.87 ^a	41.33 $\pm$ 2.82 ^{ab}	36.08 $\pm$ 4.06 ^b	29.79 $\pm$ 4.41 ^b	$\leq$ 0.05
AI (%)	78.04 $\pm$ 1.57	70.13 $\pm$ 1.82	78.42 $\pm$ 3.23	81.13 $\pm$ 1.38	79.96 $\pm$ 2.28	76.71 $\pm$ 3.93	75.92 $\pm$ 3.52	$\geq$ 0.05
HMP (%)	39.67 $\pm$ 5.13	29.33 $\pm$ 3.33	32.46 $\pm$ 4.54	51.13 $\pm$ 3.98	39.63 $\pm$ 3.06	38.58 $\pm$ 2.97	36.29 $\pm$ 2.23	$\geq$ 0.05
PIAIHP (%)	33.08 $\pm$ 4.18 ^b	28.15 $\pm$ 3.43 ^b	28.49 $\pm$ 5.00 ^b	50.26 $\pm$ 3.24 ^a	38.25 $\pm$ 4.66 ^{ab}	30.29 $\pm$ 3.70 ^b	26.87 $\pm$ 4.40 ^b	$\leq$ 0.05

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Letras sobrescritas na mesma linha diferem significativamente ($P \leq 0.05$).

Legenda: BCON (controle): sêmen adicionado somente do diluidor Botubov[®]; BIGF100: diluidor Botubov[®] acrescido de 100ng/mL de IGF-I; BIGF200: diluidor Botubov[®] acrescido de 200 ng/mL de IGF-I; BINS150: diluidor Botubov[®] acrescido de 150 μ UI/mL de Insulina; BINS200: diluidor Botubov[®] acrescido de 200 μ UI/mL de Insulina; BASS1: diluidor Botubov[®] acrescido de 100 ng/mL de IGF-I + 150 μ UI/mL de Insulina; BASS2: diluidor Botubov[®] acrescido de 200 ng/mL de IGF-I + 200 μ UI/mL de Insulina. PI= membrana plasmática intacta; AI= acrossoma intacto; HMP= alto potencial de membrana mitocondrial; PIAIHP= percentual de células com membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial.

3.5.2 *Experimento 2: Adição de diferentes concentrações de Insulina e IGF-I ao diluidor Triladyl® sobre a criopreservação de sêmen de touros Nelore*

3.5.2.1 Característica da motilidade espermática

Quando o diluidor base foi Triladyl®, notou-se também que a adição de 150 µUI/mL de Insulina (TINS150) contribuiu na preservação da motilidade espermática quando comparado aos demais grupos ($p \leq 0.05$, Tabela 3).

3.5.2.2 Membranas espermáticas

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 3, os mais altos percentuais de integridade de membrana plasmática e de alto potencial de membrana mitocondrial pós-criopreservação foram obtidos quando o diluidor foi adicionado de 150 µUI/mL de Insulina (TINS150); no entanto, estes valores não diferiram do grupo TCON; este mesmo resultado foi observado para o percentual de células PIAIHP. Em contrapartida, não foi encontrado efeito dos hormônios para integridade do acrossoma ($p > 0.05$). Observou-se que o grupo INS150 foi mais eficiente em manter a integridade da membrana plasmática e acrossomal, e alto potencial da membrana mitocondrial (PIAIHP) em relação aos grupos TIGF100, TIGF200, TASS1 e TASS2 ($p \leq 0.05$).

Tabela 3- Médias ($\pm$ erro padrão) da motilidade espermática (MT), integridade da membrana plasmática (PI), acrossoma intacto (AI) e alto potencial de membrana mitocondrial (HP) após a criopreservação utilizando Triladyl com diferentes concentrações de IGF-1 e Insulina

Parâmetros	TCON	TIGF100	TIGF200	TINS150	TINS200	TASS1	TASS2	p
MT (%)	34.58 $\pm$ 5,24 ^{bc}	39.99 $\pm$ 6,77 ^b	35.00 $\pm$ 4.54 ^{bc}	53.33 $\pm$ 5.65 ^a	46.66 $\pm$ 5.97 ^a	35.41 $\pm$ 5.74 ^{bc}	31.66 $\pm$ 3. 40 ^c	< 0.0001
PI (%)	33.70 $\pm$ 8.88 ^{ac}	26.71 $\pm$ 7.88 ^{ac}	23.25 $\pm$ 4.56 ^{bc}	38.08 $\pm$ 7.98 ^a	32.49 $\pm$ 9.40 ^{ac}	21.95 $\pm$ 5.92 ^{bc}	27.08 $\pm$ 9.14 ^{ac}	$\leq$ 0.05
AI (%)	81.70 $\pm$ 3.21	81.58 $\pm$ 1.82	80.45 $\pm$ 3.50	87.47 $\pm$ 3.89	82.29 $\pm$ 2.07	83.91 $\pm$ 3.71	83.62 $\pm$ 2.33	$\geq$ 0.05
HMP (%)	67.83 $\pm$ 4.34 ^{ab}	68.04 $\pm$ 8.98 ^{ab}	62,08 $\pm$ 7,54 ^{ab}	76.66 $\pm$ 6.58 ^a	72.16 $\pm$ 4.62 ^{ab}	64.83 $\pm$ 11.80 ^{ab}	53.16 $\pm$ 8.17 ^b	$\leq$ 0.05
PIAIHP (%)	31.58 $\pm$ 8,2 ^{ac}	26,46 $\pm$ 7.87 ^{bc}	22.62 $\pm$ 4.54 ^{bc}	37.83 $\pm$ 7.97 ^a	31.16 $\pm$ 9.20 ^{ac}	21.58 $\pm$ 5.98 ^{bc}	23.62 $\pm$ 6,78 ^{bc}	< 0.0001

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($P \leq 0.05$).

Legenda: TCON (controle): sêmen adicionado somente do diluidor Triladyl®; TIGF100: diluidor Triladyl® acrescido de 100ng/mL de IGF-I; TIGF200: diluidor Triladyl® acrescido de 200 ng/mL de IGF-I; TINS150: diluidor Triladyl® acrescido de 150 μ UI/mL de Insulina; TINS200: diluidor Triladyl® acrescido de 200 μ UI/mL de Insulina; TASS1: diluidor Triladyl® acrescido de 100 ng/mL de IGF-I + 150 μ UI/mL de Insulina; TASS2: diluidor Triladyl® acrescido de 200 ng/mL de IGF-I + 200 μ UI/mL de Insulina. MT= motilidade espermática. PI= membrana plasmática intacta; AI= acrossoma intacto; HMP= alto potencial de membrana mitocondrial; PIAIHP= percentual de células com membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com alto potencial de membrana mitocondrial.

3.6 Discussão

Diversos fatores durante a criopreservação afetam o desempenho dos espermatozoides após a descongelação, dentre eles a qualidade do sêmen que foi submetido ao processo de criopreservação; número de espermatozoides e o volume da palheta; método de congelação/descongelação; os diluidores utilizados e crioprotetores (GROTTER et al., 2019). A congelação de sêmen induz tensões físicas e químicas, que causam danos na permeabilização da membrana, mitocôndrias, acrossoma, motilidade espermática, morfologia, diminuindo a capacidade de fertilização dos espermatozoides (SHOKRI et al., 2019). Neste estudo foram adicionados IGF-I e insulina em diferentes concentrações com intuito de melhorar a preservação das funções e das características do movimento dos espermatozoides criopreservados.

Nos experimentos, utilizando Botubov® e Triladyl®, foi observado um padrão nos resultados em relação as características avaliadas e quando feito o estudo para ambos os diluidores. Os grupos que receberam insulina na concentração de 150 μ UI/mL, em ambos os experimentos, apresentaram melhor preservação das células espermáticas durante a congelação, refletindo em maior percentual de motilidade espermática e de células íntegras após a descongelação.

A motilidade espermática é um processo dependente da produção de ATP, sendo que as enzimas glicolíticas presentes na bainha fibrosa dos flagelos são uma das principais fornecedoras de energia, além das mitocôndrias, localizadas na peça intermediária, pela fosforilação oxidativa (TAKEI et al., 2014). A energia é importante para a manutenção da motilidade, para capacitação e subsequente fecundação do oócito, sendo que a energia é produzida pela metabolização dos substratos externos (DING et al., 2015). Moléculas pequenas como os monossacarídeos atravessam facilmente a bicamada da membrana plasmática dos espermatozoides, as demais moléculas recebem auxílio das proteínas de membranas que podem transportar ativamente ou passivamente a glicose (DING et al., 2015). A presença da insulina é essencial para o deslocamento da glicose pela membrana plasmática; no entanto, quando o sêmen é diluído para a criopreservação, ocorre diminuição da

concentração de insulina presente no plasma seminal, assim acredita-se que sua adição ao diluidor no presente estudo, ajudou na maior captação de glicose e subsequente produção de ATP, que é essencial para a motilidade espermática.

Outros trabalhos corroboram o presente estudo, tais como em humanos, no qual o sêmen criopreservado com diferentes concentrações de insulina (10, 100, 500 e 1000 ng/mL) resultou em aumento no número de espermatozoides móveis nas diferentes concentrações (SHOKRI et al., 2019). Em adição, em outro estudo com sêmen humano notou-se que a suplementação com insulina (10 μ mol) e leptina, prolongou a preservação da motilidade espermática e reação acrossomal, aumentando assim a capacidade fecundante aos oócitos (LAMPIÃO e PLESSIS, 2008). Em homens com deficiência na produção de insulina apresentam menores percentuais de motilidade espermática e aumento de defeitos espermáticos, principalmente acrossomal (BACCETTI et al., 2002). Outra explicação para a ação sobre a cinética espermática, é que a insulina possui afinidade cerca de 100 a 1000 vezes pelos receptores heterólogos presentes nas membranas dos espermatozoides, neste caso aos do IGF-I, assim favorece a motilidade espermática pela maior captação de glicose (CLEMMONS, 1992).

No presente estudo, foi verificado maior percentual de células com membrana plasmática intacta, acrossoma intacto e com potencial mitocondrial (PIAHP) quando adicionado de insulina (150 μ UI/mL) aos dois diluidores. Tais respostas da ação da insulina pode ser assegurada, pois a membrana plasmática, acrossomal e o metabolismo são alvos citológicos (SOUZA et al., 2010). Durante a criopreservação do sêmen, no intervalo de temperatura entre 15 a 5°C, ocorrem as principais alterações nas membranas, como ruptura e perda nos arranjos dos fosfolipídios. Neste intervalo, a membrana plasmática altera seu estado de líquido para gel, acarretando diminuição da motilidade e maior permeabilidade. As proteínas integrais, presentes nas membranas plasmáticas, também podem sofrer modulações durante a criopreservação (WATSON, 2000). Assim, acredita-se que a insulina se ligue aos receptores presentes na membrana do espermatozoide o que permite maior proteção durante o processo de criopreservação.

Reforçando as respostas aqui encontradas, segundo Aquila et al. (2005), o espermatozoide mobiliza a insulina de seus grânulos no momento da hiperativação, esse processo desencadeia maior aporte de energia para a célula

espermática, que, por sua vez, desestabiliza os componentes que mantêm a integridade das membranas plasmática e acrossomal antes da reação acrossômica. Essa afirmação foi verificada no presente estudo, pois os tratamentos que continham insulina, principalmente na concentração de 150 μ UI/mL apresentaram o maior percentual de células intactas (PIAIHP). O mesmo foi observado quando avaliada a integridade das membranas separadamente para ambos os diluidores testados.

Corroborando estes achados, Van Tilburg et al. (2008) verificaram efeito significativo da insulina sobre a integridade do acrossoma, sendo que os mesmos relatam que quanto maior a concentração de insulina adicionada no diluidor de congelação maior a quantidade de espermatozoide com acrossoma íntegro, e que a insulina não induz a reação acrossômica e sim preserva a integridade do acrossoma, atribuindo a ação da insulina sobre o acrossoma pela inibição da ligação do AMPc à proteína quinase dependente ao AMPc e ativação da fosfatidilinositol 3-,4-bisfosfato e fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato, mecanismos responsáveis pela capacitação e reação acrossômica. No entanto, este efeito não foi observado no presente estudo.

Em relação ao IGF-I, não foi observado um efeito significativo da sua ação nos diferentes diluidores, o mesmo observado por Costa et al. (2020) em estudo com sêmen criopreservado de bovinos utilizando 150ng/mL de IGF-I adicionados ao diluidor. Os achados do presente estudo contrastam com os estudos em bovinos, cães, equinos, bubalinos, caprinos e ovinos (HENRICKS et al., 1998, PAN et al., 2015, SANG-MIN et al., 2014, SERVERAJU et al., 2009, MASKAREVICH et al., 2014, PADILHA et al., 2012) que verificaram melhoria na qualidade dos espermatozoides quando suplementados com diferentes concentrações de IGF-I. Segundo Kumar et al. (2019), o IGF-I aumenta a concentração intracelular de cálcio, resultando em maior motilidade progressiva dos espermatozoides em búfalos. Contudo, isso não foi notado no estudo atual, e pode ser explicado pela diferença na composição das membranas e a sensibilidade à criopreservação entre as espécies e a concentração utilizada do IGF-I adicionado nos diluidores de criopreservação.

A adição de IGF-I e insulina associados, não melhorou a qualidade espermática após a descongelação tanto no Triladyl® quanto para o Botubov®. Esperava-se que o IGF-I por ter ação sobre a motilidade espermática e pela

velocidade linear, por meio da ligação com os receptores presentes nos espermatozoides, e a insulina atuando sobre o metabolismo (SOUZA et al., 2010), a associação destes hormônios iria garantir melhor preservação das células. Os grupos associados apresentaram menor percentual da motilidade espermática e menor número de células íntegras. Provavelmente a concentração utilizada nestas associações proporcionou efeito citotóxico aos espermatozoides, diminuindo a motilidade espermática, a integridade das membranas e proporcionando maior danos as células.

3.7 Conclusão

A adição de 150 μ UI/mL de insulina aos diluidores à base de gema de ovo (Botubov® e Triladyl®), para a criopreservação de sêmen de touros da raça Nelore, melhora a preservação da motilidade espermática e da integridade da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial após a descongelação.

CAPÍTULO 3:

A ADIÇÃO DE IGF-I E INSULINA AO DILUIDOR MELHORA A QUALIDADE ESPERMÁTICA E A FERTILIDADE DE SÊMEN DE TOUROS DE BAIXA CONGELABILIDADE?

4. A ADIÇÃO DE IGF-I E INSULINA AO DILUIDOR MELHORA A QUALIDADE ESPERMÁTICA E A FERTILIDADE DE SÊMEN DE TOUROS DE BAIXA CONGELABILIDADE?

4.1 Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar o impacto da adição de insulina e do IGF-I em sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade sobre motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica, estabilidade das membranas e taxa de prenhez por inseminação artificial em tempo fixo (IATF). Foram realizados dois experimentos. No experimento 1, foram utilizados quatro ejaculados de 10 touros de alta (n=40) e de 10 touros de baixa (n=40) congelabilidade, que foram divididos em três frações iguais, sendo acrescentados os tratamentos: Controle: somente diluidor Triladyl®; IGF: diluidor Triladyl® adicionado de IGF-I (100 ng/mL) e INS: diluidor Triladyl® adicionado de Insulina (150 µUI/mL). Após a criopreservação, o sêmen foi avaliado quanto a motilidade (CASA), integridade de membrana plasmática (Live:Dead sperm Viability Kit), integridade do acrossomo (FITC-PSA), peroxidação lipídica (BODIPY) e estabilidade das membranas (Merocianina 540). A adição de insulina melhorou a preservação da motilidade subjetiva, total, progressiva e velocidade do trajeto e a integridade de membrana plasmática e acrossomal na categoria de baixa congelabilidade em relação à adição de IGF-I ou controle. A insulina diminuiu a peroxidação e a desordem lipídicas, aumentando a estabilidade das membranas. No experimento 2, foi avaliado o efeito da adição de insulina ao diluidor de criopreservação sobre a taxa de prenhez por IATF. Dois ejaculados de três touros de alta (n=6) e de três touros de baixa (n=6) congelabilidade foram utilizados. Cada ejaculado foi dividido em duas frações e acrescentado os tratamentos: Controle: somente diluidor Triladyl® e INS: diluidor Triladyl® adicionado de Insulina 150 µUI/mL, ambos criopreservados em sistema automatizado. Foram submetidas à IATF 1022 vacas, distribuídas em quatro grupos: 1) sêmen de alta congelabilidade e controle (n=252), 2) sêmen de alta congelabilidade e INS (n=257), 3) sêmen de baixa congelabilidade e controle (n=261), 4) sêmen de baixa congelabilidade e INS (n=252). A adição de insulina ao diluidor do sêmen criopreservado não influenciou na taxa de prenhez após a

IATF. Conclui-se que a adição de insulina aos diluidores de criopreservação de sêmen é capaz de preservar a motilidade espermática, integridade da membrana plasmática e acrossomal, diminui a peroxidação lipídica e aumenta a estabilidade das membranas, principalmente em touros de baixa congelabilidade; contudo, não influencia a taxa de prenhez.

Palavra-chave: Bovino, Espermatozoides, Congelação, Inseminação Artificial, IATF

4.2 Introdução

A criopreservação de sêmen é amplamente utilizada nos programas que empregam a inseminação artificial, e é de grande importância a qualidade do sêmen para obtenção de bons resultados na taxa de prenhez (NOGUEIRA et al., 2019). Com o intuito de aumentar a produção na bovinocultura, aumentou a procura por sêmen congelado de touros geneticamente superiores no Brasil, tornando-se indispensável nas principais biotécnicas da reprodução (EMERICK et al., 2011). A congelação de sêmen consiste na estabilização das células em temperaturas criogênicas, sendo um dos métodos mais eficientes para a preservação dos espermatozoides a longo prazo (YESTE, 2016) facilitando o armazenamento e o transporte, tendo como objetivo a manutenção da viabilidade e funcionalidade dos espermatozoides, apesar de causar injúrias sobre a estrutura celular (GROTTER et al., 2019).

Inúmeros estudos, nas diferentes espécies, já foram realizados; entretanto, é conhecido que cerca de 50% dos espermatozoides pós-descongelação são preservados e os que sobrevivem são comprometidos, acarretando na diminuição na motilidade espermática e danos as membranas plasmáticas e acrossomal, culminando com a diminuição da capacidade fecundante desses espermatozoides (LAYEK et al., 2016). Diversos fatores podem afetar a sobrevivência do sêmen criopreservado, dentre eles se tem: os diluidores e suas composições, os crioprotetores, a curva utilizada durante o processo, efluxo de colesterol e fluxo de cálcio e sódio e a produção de espécies reativas de oxigênio dos espermatozoides mortos (LAYEK et al., 2016).

A congelabilidade do sêmen é um fator de extrema importância para promover multiplicação do material genético (RONCOLLETTA et al., 1999) e a capacidade do sêmen para congelar e descongelar bem, é característico de cada animal (RONCOLETTA et al., 2013), dessa forma, os reprodutores podem ser classificados como indivíduos de alta e baixa congelabilidade, independente de apresentarem boas características espermáticas no sêmen *in natura*. Alguns fatores podem justificar essa sensibilidade seminal de alguns animais a criopreservação, dentre eles a composição das membranas plasmáticas, plasma seminal e mudanças moleculares (GARCIA et al., 2011; ALVAREZ et al., 2008; UGUR et al., 2019).

A membrana plasmática é uma das partes estruturais dos espermatozoides mais suscetível aos danos da criopreservação (SILVA e GUERRA, 2011), sendo que uma menor proporção de lipídios insaturados pode acarretar na menor criotolerância, como relatado por Garcia et al. (2011) em equinos e em bovinos por Zorzetto (2016). Enquanto, o plasma seminal é uma secreção complexa das glândulas acessórias, testículos e epididimárias com variadas funções, tais como carreador do gameta masculino até o trato reprodutivo da fêmea, participante do processo de capacitação espermática e reação acrossomal (ARAÚJO, 2014). As proteínas são os principais constituintes do plasma seminal, sendo consideradas moduladoras das funções espermáticas (LEAHY e GRAAF, 2012). As proteínas do plasma seminal e as células espermáticas foram correlacionadas com a resistência a danos às células espermáticas durante a criopreservação (RÊGO et al., 2014).

Dessa forma, o processo de criopreservação induz tensões físicas e químicas, que causam danos na permeabilidade da membrana, mitocôndrias, acrossoma, aumentam defeitos na morfologia, diminuindo motilidade espermática, viabilidade e a capacidade de fertilização dos espermatozoides (SHOKRI et al., 2019). Associado a diferença de congelabilidade entre animais, foi proposto o uso de insulina e do IGF-I, com intuito de melhorar as características espermáticas após o processo de criopreservação. A insulina é uma proteína formada por duas cadeias (α e β), com 21 e 30 aminoácidos, que fornece energia ao espermatozoide, sendo liberada no ejaculado, com produção do NADPH, influenciando na capacitação espermática e metabolismo autócrino (ANDÓ e ÁQUILA, 2005). Estudos comprovam seu efeito na capacitação

espermática (AQUILA et al., 2013), ação antioxidante e preservação da motilidade espermática (SHOKRI et al., 2019), bem como na preservação da integridade das membranas plasmática e acrossomal das células espermáticas (VAN TILBURG et al., 2008). O IGF-I é componente do plasma seminal secretado pelas células de Leydig e Sertoli, tendo uma importante função da espermatogênese e esteroidogênese (KUMAR et al., 2019). O IGF-I estimula e preserva a motilidade espermática e a integridade da membrana plasmática e acrossomal, como demonstrado para as espécies bovina (HENRICKS et al., 1998), suína (SILVA et al., 2011b) e bubalina (SELVARAJU et al, 2010 e 2016); além disso na espécie equina, promoveu aumento da taxa de prenhez (MACPHERSON et al., 2002).

Com base nas informações anteriores, este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da suplementação de insulina e IGF-I na criopreservação de sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade. Tendo como hipóteses: 1- A adição de insulina ou IGF-I melhora a preservação da motilidade espermática, integridade das membranas plasmática e acrossomal, e previne a peroxidação lipídica e a desordem das membranas; 2- Os efeitos benéficos da adição de insulina e do IGF-I em preservar melhor as características espermáticas após a criopreservação são mais evidentes em touros de baixa congelabilidade; 3- A suplementação de insulina aumenta a taxa de prenhez. Assim, o objetivo deste trabalho foi analisar o impacto da suplementação de insulina e do IGF-I ao diluidor para a criopreservação de sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade sobre as características da motilidade, integridade das membranas plasmática e acrossomal, peroxidação lipídica, estabilidade das membranas e sobre a taxa de prenhez na IATF.

4.3 Material e métodos

4.3.1 Local do estudo e período experimental

A parte experimental relacionadas ao sêmen foi conduzida na Central de Processamento e Colheita de sêmen - Alta Genetics, localizada no município de Uberaba, MG. As análises do sêmen pós-criopreservação foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia do Sêmen e Andrologia e no Laboratório de

Andrologia e Transferência de Embriões Suínos do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, localizado no *Campus* Fernando Costa em Pirassununga, SP, como também no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais localizado no Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Pirassununga, SP. As informações sobre a taxa de prenhez foram obtidas das fazendas Berro d'água (Água Clara- MS), Nossa Senhora (Água Clara- MS) da Muxima (Água Clara- MS) , Tarumã (Jateí- MS), Cachoeira (Dois Irmãos do Buriti- MS) e Sucuri (Tereno- MS) localizadas no estado do Mato Grosso do Sul- MS.

O período experimental foi de outubro a novembro de 2018 (experimento 1) e de dezembro a março de 2019 (experimento 2). Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo-USP/Brasil, com número de registro 2861160816.

4.3.2 *Experimento 1: Adição de Insulina e IGF-I no sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade e seus efeitos após a descongelação*

4.3.2.1 Animais e manejo nutricional

Utilizou-se para este experimento quatro ejaculados de 10 touros de alta congelabilidade (n=40) e 10 touros de baixa congelabilidade (n=40). Os touros apresentavam idade média de $64,09 \pm 31,73$ meses e escore de condição corporal entre 4 e 5 (com escala de 1 a 5). Para classificação em alta e baixa congelabilidade foi realizado estudo retrospectivo no banco de dados fornecidos pela Central de Colheita e Processamento de Sêmen - Alta Genetics, baseando-se nas características do sêmen antes e após a descongelação (motilidade espermática, vigor espermático e teste de termorresistência rápido-TTR), em média foram utilizados dados referente a 15 ejaculados e suas respectivas congelações. Os parâmetros utilizados para classificação dos touros estão descritos na tabela 5.

Tabela 4- Parâmetros utilizados para separação dos animais em alta e baixa congelabilidade

Classificação	Motilidade e vigor espermático	TTR (motilidade e vigor espermático)
Alta congelabilidade	≥49%/4	≥35%/3
Baixa congelabilidade	<49%/4	<35%/3

Fonte: Pinto (2020).

Os animais eram mantidos em piquetes individuais, com sombreamento natural e artificial. Os piquetes apresentavam cama de areia, área de pastagem e cocho. Eram fornecidos água e sal mineral *ad libitum* e alimentação com silagem de milho e feno de coast cross, núcleo proteico, farelo de soja, duas vezes ao dia, totalizando 20 kg por animal, de acordo com o preconizado pela empresa.

4.3.2.2 Colheita e avaliação do sêmen pré-criopreservação

A colheita do sêmen foi feita por vagina artificial (modelo IMV Technologies®) e estas por sua vez estavam aquecidas 45°C e lubrificadas. Foram utilizados apenas os ejaculados que apresentavam motilidade espermática ≥60%, vigor espermático ≥3 (escore 1-5) e concentração espermática ≥ 600x10⁶ spz/mL. Após a colheita, o sêmen era enviado imediatamente ao laboratório e mantido a 37°C. Cada ejaculado foi avaliado quanto ao volume, concentração espermática, motilidade espermática e vigor espermático e morfologia espermática.

O volume espermático foi determinado por balança digital de precisão, pesando-se o tubo mais o ejaculado, e o valor em gramas era transformado em mililitros, e de acordo com o volume era realizado o cálculo para a adição de antibióticos. A concentração espermática foi determinada por espectrofotômetro (Genesys 20, Thermo Scientific™), para isso 50 µL do sêmen era adicionado em cubetas preenchidas com 7 mL de solução de formol (0,9% de solução fisiológica 0,9% e 1% de formol) após a homogeneização era feita a leitura. A motilidade e o vigor espermático foram estimados por microscópio de contraste de fase (modelo Nikon Eclipse 2002i), por único operador. A motilidade era determinada em percentual de espermatozoides móveis e o vigor espermático em escore de 1-5, segundo o preconizado para a espécie bovina pelo CBRA (2013). A morfologia espermática foi realizada sob microscopia de contraste de

interferência diferencial (DIC, Nikon, Eclipse 80i), entre lâmina e lamínula em aumento de 1000x. Foram contadas 200 células e os resultados expressos em porcentagem, classificados em defeitos maiores e menores, segundo Blom (1973).

4.3.2.3 Tratamento e criopreservação de sêmen

Após as avaliações prévias, o sêmen foi fracionado e diluído (30×10^6 spz/totais) com Triladyl® (Minitube®, preparado segundo o fabricante) e acrescentados os tratamentos. As concentrações utilizadas neste experimento foram baseadas no teste de concentrações realizadas no estudo anterior com o Botubov® e Triladyl®. Assim, os grupos foram: Grupo controle: somente diluidor Triladyl® (CON); Grupo IGF: diluidor Triladyl® acrescido de 100 ng/mL de IGF-I; Grupo INS: diluidor Triladyl® acrescido de 150 μ UI/mL de Insulina.

O sêmen diluído e suplementado com as diferentes concentrações dos hormônios permaneceu por 10 minutos incubados a 37°C, para a interação sêmen x tratamento. Após esse período, os tubos cônicos de 15 mL contendo o sêmen diluído foram depositados em frascos contendo água a 37°C, visando evitar o choque térmico. Estas amostras foram encaminhadas para câmara fria (4°C), onde permaneceram por três horas para refrigeração e equilíbrio. Em seguida, foi realizado o envase do sêmen em palhetas (0,25 mL), refrigeradas a 4°C, sendo estas identificadas com nome do animal, partida, data e tratamento.

Após a etapa de refrigeração, as palhetas foram alocadas em rampas e levadas para máquina de congelação (modelo TurboFreezer L, Minitube®). A criopreservação foi realizada segundo os protocolos da empresa Alta Genetics Brasil, todas as partidas de sêmen passaram pela mesma curva de congelação e todos os tratamentos eram congelados de forma simultânea (a curva e detalhe do processo de criopreservação não serão apresentados por questões éticas e sigilo empresarial).

4.3.2.4 Avaliação do sêmen pós-criopreservação

Duas palhetas de sêmen de cada partida e tratamento foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 segundos, o sêmen

homogeneizado e avaliado. A avaliação constitui na análise das características do movimento espermático, integridade de membranas plasmática e acrossomal, índice da peroxidação lipídica e estabilidade (Fluidez) das membranas.

4.3.2.4.1 Avaliação da motilidade espermática

As características do movimento espermático foram avaliadas pelo sistema computadorizado de análise espermática - CASA (SCA® - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha). O setup foi ajustado previamente para avaliação de espermatozoides de bovinos. Para a realização das análises, as amostras foram diluídas para concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL em meio *TALP sperm* (BAVISTER e LORRAINE, 1983). A amostra de sêmen diluído foi colocada na câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) para avaliação. As características investigadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilinear (VCL, $\mu\text{m/s}$), oscilação do trajeto real (WOB, %) deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

4.3.2.4.2 Avaliação da membrana plasmática

Para avaliação da integridade da membrana plasmática foi utilizado o teste de Live:Dead sperm Viability Kit (Thermo Fischer™), esse kit é composto por dois fluoróforos, SYBR-14 (1 mM, 1:10 em DMSO) e Iodeto de propídio (IP, 2,4 mM; pronto para o uso). Para avaliação, as amostras de sêmen foram descongeladas e incubadas a 37°C por 10 minutos. Após esse período, foi realizada a homogeneização em vórtex por 1-2 segundos e 10 μL foram retirados e depositados em 990 μL da Solução Stain (25 μL SYBR-14+125 μL IP+ 25 mL de PBS) incubados por 7 minutos a 37°C. A leitura foi feita no citômetro de fluxo, modelo CyFlow (Sysmex®, Espanha). As amostras foram processadas a uma taxa de aquisição de aproximadamente 600–1000 eventos/s, adquirindo 5.000 células por análise.

4.3.2.4.3 Avaliação da membrana acrossomal

Para avaliação da integridade acrossomal, as amostras de sêmen foram diluídas em TALP *sperm* (BAVISTER e LORRAINE, 1983) para concentração de 5×10^6 sptz/mL. Após a diluição, a amostra do sêmen diluído foi incubada com 1 μ L Syto 59 (5mM; Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, EUA) por 10 minutos, passado esse período 1 μ L de Iodeto de propídio (0,5 mg/mL em DPBS, Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, EUA) foi adicionado permanecendo em incubação por 10 minutos. Após a incubação, 1 μ L de FITC-PSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) foi adicionada mantendo-se em incubação por 10 minutos. Em seguida, foi feita a diluição em 150 μ L em TALP *sperm* e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. O citômetro de fluxo utilizado foi do modelo BD FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) controlado pelo software BD FACSDiva 6.0. Esse citômetro possui os lasers de argônio a 488 nm e laser near-UV a 375 nm que são responsáveis pela leitura simultânea. As amostras foram processadas a uma taxa de aquisição de aproximadamente 600–1000 eventos/s, adquirindo 10.000 células por análise (Apêndice A).

4.3.2.4.4 Avaliação da estabilidade (fluidez) das membranas

Para avaliação da estabilidade das membranas, o sêmen foi diluído em TALP *sperm* (BAVISTER e LORRAINE, 1983) para concentração de 5×10^6 sptz/mL. Após a diluição, a amostra do sêmen diluído foi incubada por 10 minutos com 1 μ L de Yo-Pro (7,5 μ M; Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, EUA), passado esse período 3 μ L de Syto 59 (5 mM; Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, EUA) foi adicionado permanecendo em incubação por 10 minutos. Após a incubação, 2 μ L de Merocianina 540 (810 μ M; Molecular Probes Inc Eugene, Oregon, EUA) foi adicionada e incubado por 70 segundos. Em seguida, foi feita a diluição em 150 μ L em TALP *sperm* e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. O citômetro de fluxo utilizado foi do modelo BD FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) controlado pelo software BD FACSDiva 6.0. Esse citômetro possui os lasers de argônio a 488 nm e laser near-UV a 375 nm que são responsáveis pela leitura simultânea. As amostras foram

processadas a uma taxa de aquisição de aproximadamente 600–1000 eventos/s, adquirindo 10.000 células por análise (Apêndice B).

4.3.2.4.5 Avaliação da peroxidação lipídica

Para determinar a peroxidação lipídica as amostras foram primeiramente diluídas em TALP sperm (BAVISTER e LORRAINE, 1983) para concentração de 5×10^6 spz/mL. Posteriormente, foram incubadas com 1 μ L C11-BODIPY® (Molecular Probes Inc Eugene, Oregon, EUA) por 20 minutos a 37°C. Em seguida foi acrescentado 1 μ L iodeto de propídio (0,5 mg/mL; Molecular Probes Inc Eugene, Oregon, EUA) mais 3 μ L de Syto 59 (5 mM; Molecular Probes Inc, Eugene, Oregon, EUA) permanecendo em incubação por 10 minutos. Em seguida, foi feita a diluição em 150 μ L em TALP sperm e as amostras foram analisadas por citometria de fluxo. O citômetro de fluxo utilizado foi do modelo BD FACSAria (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) controlado pelo software BD FACSDiva 6.0. Esse citômetro possui os lasers de argônio a 488 nm e laser near-UV a 375 nm que são responsáveis pela leitura simultânea. As amostras foram processadas a uma taxa de aquisição de aproximadamente 600–1000 eventos/s, adquirindo 10.000 células por análise (Apêndice C).

4.3.3 *Experimento 2: Suplementação de insulina para a criopreservação de sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade sobre a fertilidade na IATF em vacas Nelore*

4.3.3.1 Animais e manejo nutricional

Utilizou-se para este experimento dois ejaculados de três touros de alta congelabilidade (n=6) e de três touros de baixa congelabilidade (n=6), escolhidos de forma aleatória dentro do grupo de animais de alta e baixa congelabilidade utilizadas no experimento 1. Nesse período os touros encontravam-se com idade média de $69,09 \pm 31,73$ meses, com escore de condição corporal entre 4 e 5 (com escala de 1 a 5). Durante todo período experimental os animais eram mantidos em piquetes individuais, com sombreamento natural e artificial. Os piquetes apresentavam cama de areia, área de pastagem e cocho. Eram

fornecidos água e sal mineral *ad libitum* e alimentação com silagem de milho e feno de coast cross, núcleo proteico, farelo de soja, duas vezes ao dia, totalizando 20 kg por animal.

4.3.3.2 Colheita e análise do sêmen pré-criopreservação

As colheitas foram realizadas por vagina artificial (modelo IMV, IMV Technologies®) e estas por sua vez estavam aquecidas a 45°C e lubrificadas. Foram utilizados apenas os ejaculados que apresentavam motilidade espermática $\geq 60\%$, vigor espermático ≥ 3 (1-5) e concentração espermática $\geq 600 \times 10^6$ spz/mL. As avaliações foram realizadas como descrito no experimento 1.

4.3.3.3 Tratamento e criopreservação do sêmen

Após as avaliações prévias, o sêmen foi fracionado e diluído (25×10^6 spz/mL) com Triladyl® (Minitube®, preparado segundo o fabricante) e acrescentados os tratamentos. Nesse experimento, utilizou-se o tratamento que apresentou melhor resposta nas características avaliadas no experimento 1, neste caso a Insulina. Assim, os grupos testados foram: Grupo controle: somente diluidor Triladyl®; Grupo Ins: diluidor Triladyl® adicionado de 150 μ UI/mL de Insulina. Foram preparadas 1200 doses, sendo 200 doses por touro, destas 100 doses por tratamento.

O sêmen diluído e suplementado com a insulina permaneceu por 10 minutos incubados a 37°C para a interação sêmen x tratamento. Após esse período, os tubos com o sêmen diluído foram depositados em frascos contendo água a 37°C, visando evitar o choque térmico. Estas amostras foram encaminhadas para câmara fria (4°C), onde permaneceram por três horas para refrigeração e equilíbrio. Em seguida, as amostras foram então envasadas em palhetas de 0,25 mL (IMV Technologies®) identificadas com o nome do touro, partida do ejaculado e tratamento. Para facilitar a identificação dos tratamentos a campo pelo inseminador foram utilizadas palhetas francesas de cores distintas, transparente para o grupo controle e amarela para grupo insulina.

Após a etapa de refrigeração, as palhetas foram alocadas em rampas e levadas para máquina de congelação (modelo TurboFreezer L, Minitube®). A criopreservação foi realizada segundo os protocolos da empresa Alta Genetics do Brasil, todas as partidas de sêmen passaram pela mesma curva de congelação e todos os tratamentos eram congelados de forma simultânea (a curva e detalhe do processo de criopreservação não serão apresentados por questões éticas e sigilo empresarial).

4.3.3.4 Avaliação do sêmen pós-criopreservação

Duas palhetas de cada partida e tratamento foram descongeladas em banho-maria por 30 segundos a 37°C colocadas em microtubo, homogeneizadas e avaliadas. A avaliação constitui na análise das características do movimento espermático, integridade de membranas plasmáticas, acrossomal e potencial mitocondrial.

4.3.3.4.1 Avaliação da motilidade espermática

As características do movimento espermático foram avaliadas pelo sistema computadorizado de análise espermática - CASA (SCA® - Sperm Class Analyser; MICROPTIC, Barcelona, Espanha). O setup foi ajustado previamente para avaliação de espermatozoides de bovinos. Para a realização das análises, as amostras foram diluídas para concentração de 10×10^6 espermatozoides/mL em meio *TALP sperm* (BAVISTER e LORRAINE, 1983). A amostra de sêmen diluído foi colocada na câmara de Makler® (Selfi-Medical Instruments, Haifa, Israel) para avaliação. As características investigadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), velocidade do trajeto (VAP, $\mu\text{m/s}$), velocidade progressiva (VSL, $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL, $\mu\text{m/s}$), oscilação do trajeto real (WOB, %) deslocamento lateral da cabeça (ALH, μm), frequência de batimento (BCF, Hz), retilinearidade (STR, %) e linearidade (LIN, %).

4.3.3.4.2 Avaliação das membranas espermáticas

Para avaliar as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, 150 µL do sêmen diluído em meio TALP sperm (BAVISTER e LORRAINE, 1983), na concentração de 10×10^6 espermatozoide/mL, foi depositado em um microtubo e adicionados 2 µL de Hoestch 33342 (H342, 0,5 mg/mL, Molecular Probes, H1399), 2 µL de Iodeto de propídeo (PI, 0,5 mg/mL em DPBS, Molecular Probes, P3566), 6 µL de Iodeto de tetacoloro – tetraetilbenzimidazonilcarbonianina (JC-1, 153 µM em DMSO, Molecular Probes, T3168) e 20 µL de aglutinina de *Pisum sativum* conjugada ao isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, 100 µg/mL em DPBS).

As amostras foram incubadas por 8 minutos a 37°C. Após a incubação, uma gota (4 µL) desta foi colocada entre lâmina e lamínula (pré-aquecidas a 37°C) e a leitura foi realizada sob microscopia de epifluorescência (Microscópio de Epifluorescência marca Nikon, Modelo Eclipse 80i) em um filtro triplo (D/F/R, C58420) apresentando os conjuntos UV-2E/C (excitação 340-380nm e emissão 435-485nm), B-2E/C (excitação 465-495nm e emissão 515-555nm) e G-2E/C (excitação 540-525nm e emissão 605-655nm), com aumento de 1.000x. Foram contadas 200 células, classificadas em oito categorias de acordo com a fluorescência emitida por cada sonda, conforme Celeghini et al. (2008), e os resultados expressos em porcentagem. Desta avaliação foram considerados os percentuais de integridade de membrana plasmática (IP), integridade de acrossoma (IA) e potencial de membrana mitocondrial (HMP), bem como foi considerado o percentual de espermatozoides apresentando simultaneamente integridade das membranas plasmática acrossomal e alto potencial de membrana mitocondrial (PIAIHP).

4.3.3.5 Inseminação artificial em tempo fixo (IATF)

Para a IATF foram utilizadas as informações de 1022 fêmeas da raça Nelore (*Bos indicus*), sendo 559 novilhas e 463 pluríparas. Os animais apresentavam escore de condição corporal médio de $3,27 \pm 0,24$ e $3,01 \pm 0,31$ respectivamente, em uma escala de 1 a 5 (1= magra e 5=obesa) segundo Ayres et al. (2009), vacas muito magras ou obesas eram descartadas. Todos os animais foram submetidos a exame ginecológico prévio, por ultrassonografia,

antes de serem sincronizados. Foram utilizadas somente vacas sem alterações reprodutivas.

O protocolo para a IATF utilizado foi iniciado em dias aleatórios do ciclo estral (Figura 1). As novilhas no início do protocolo, receberam, D0, um dispositivo intravaginal de progesterona (P4, CIDR com 1,9 g de progesterona, Zoetis®) e 2 mg (2mL) de benzoato de estradiol (100 mg/mL, Gonadiol, Zoetis®). No D9, o dispositivo intravaginal foi retirado e as vacas foram tratadas com 0,6 mg (0,3 mL) de cipionato de estradiol (2 mg/mL, E.C.P., Zoetis®), 12,5 mg (2,5 mL) de prostaglandina (5 mg/mL, Lutalyse, Zoetis) e 200 UI (1,5 MI) de eCG (5000 UI, Novormon, Zoetis®). As pluríparas no início do protocolo, receberam, D0, um dispositivo intravaginal de progesterona (P4, CIDR com 1,9 g de progesterona, Zoetis®) e 2 mg (2mL) de benzoato de estradiol (100 mg/mL, Gonadiol, Zoetis®). No D7, 12,5 mg (2,5 mL) de prostaglandina (5 mg/mL, Lutalyse, Zoetis). No D9, o dispositivo intravaginal foi retirado e as vacas foram tratadas com 0,6 mg (0,3 mL) de cipionato de estradiol (2 mg/mL, E.C.P., Zoetis®), 12,5 mg (2,5 mL) de prostaglandina (5 mg/mL, Lutalyse, Zoetis) e 300 UI (1,5 MI) de eCG (5000 UI, Novormon, Zoetis®). No D11, as vacas foram inseminadas 48 horas após a remoção do dispositivo de progesterona.

Os animais selecionados foram alocados dentro de um fatorial 2x2 (alta e baixa congelabilidade x controle e INS), as 1022 vacas foram distribuídas aleatoriamente nos seguintes grupos de acordo com o sêmen utilizado: 1). fêmeas receberam sêmen de alta congelabilidade e controle (n=252), 2) fêmeas foram inseminadas com sêmen de alta congelabilidade e INS (n=257), 3) fêmeas foram inseminadas com sêmen de baixa congelabilidade e controle (n=261) e 4) fêmeas foram inseminadas com sêmen de baixa congelabilidade e INS (n=252).

As doses de sêmen foram independentemente do número de lotes e de fazendas obedecendo os tratamentos e touros em cada um dos lotes. A cada 10 doses por touro e tratamento era feito o rodízio. Lotes que tiverem menos que 120 vacas as inseminações eram reiniciadas na sequência que terminaram no lote anterior. O diagnóstico das gestações foi feito 60 dias após a IATF por exame ultrassonográfico transretal equipado com sonda de arranjo linear de 5MHz em modo B.

Figura 1- Esquema experimental das vacas submetidas à IATF.

Fonte: Pinto (2020).

Legenda: No D0, as novilhas e pluríparas receberam implante de progesterona e benzoato de estradiol. As pluríparas no D7, receberam a primeira dose da prostaglandina. No D9, foi retirado o implante de progesterona e foi administrado cipionato de estradiol, prostaglandina e gonadotrofina coriônica equina e após 48 horas as fêmeas foram inseminadas.

4.4 Análise estatística

Os dados das características espermáticas foram analisados pelo procedimento misto PROC GLIMMIX do SAS (Versão 4.0 SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA), foram feitas avaliações quanto à normalidade testada pela ANOVA, comparando-se as médias pelo teste de Tukey. As variáveis que tinham resposta subjetivas ou anormais foram tratadas como não paramétricas pelo Teste de Kruskal-Wallis. Foram considerados os efeitos de tratamento (controle, insulina e IGF) e grupo (alta e baixa congelabilidade). Para o diagnóstico gestação os dados foram analisados usando vaca como unidade experimental independente de categoria. Utilizou-se o PROC GLIMMIX para dados binários fatorial 2x2. (Versão 4.0 SAS Inst. Inc., Cary, NC, EUA). Os modelos continham os efeitos fixos de tratamento, ECC, classificação do touro e a interação entre tratamento e classificação do touro (alta ou baixa congelabilidade). As variáveis aleatórias foram vacas dentro de cada lote, além de touro e inseminador. Significância estatística foi determinada quando $P \leq 0,05$. Quando a probabilidade variou entre 0,05 e 0,1 foi considerado como diferença aproximando-se significativamente.

4.5 Resultados

4.5.1 *Experimento 1: Adição de Insulina e IGF-I no sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade e seus efeitos após a descongelação*

4.5.1.1 Motilidade espermática

Na figura 2 (A), é possível verificar a interação de tratamento x congelabilidade para motilidade subjetiva ($p \leq 0,001$). A motilidade subjetiva foi maior para os animais de alta congelabilidade do que os de baixa congelabilidade. Dentro de cada categoria, a adição de 150 $\mu\text{UI/mL}$ de insulina melhorou a preservação da motilidade espermática em relação ao grupo controle e ao IGF. E quando analisado a diferença da motilidade espermática inicial e após o processo de criopreservação do sêmen, observa-se a interação congelabilidade x tratamento (Figura 2, B). Nota-se que os animais de alta congelabilidade apresentaram maior resistência ao processo de congelação, com menor perda da motilidade espermática quando comparado aos animais de baixa congelabilidade ($19,23 \pm 0,75$ vs $23,55 \pm 0,77$, $p \leq 0,001$). O tratamento insulina obteve maior preservação das células espermáticas, com menor perda da motilidade espermática em relação ao grupo controle e IGF ($p \leq 0,001$).

Figura 2. Média ($\pm$ erro padrão) das características espermáticas da motilidade (subjativa e CASA) para sêmen criopreservado de touros de alta e baixa congelabilidade nos diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Pontos com letras minúsculas (a e b) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do tratamento. Pontos com letras maiúsculas (A e B) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do grupo. Asterisco sobrescrito (*) indicam tendência de diferença estatística ($P \leq 0,1$)

Legenda: Painel A: Motilidade subjetiva. B: Diferença %: Diferença da porcentagem da motilidade inicial e após a descongelação. Probabilidade para efeito de tratamento (T), congelabilidade (G) e interação tratamento x congelabilidade (TG) que apresentaram diferença estatística significativa ou tendência estão apresentados.

Em relação às características avaliadas pelo CASA, para motilidade total houve interação tratamento x congelabilidade ($p \leq 0,001$, Figura 3, A). O grupo alta congelabilidade teve maior percentual de motilidade total que os animais de baixa congelabilidade. O grupo de congelabilidade baixa, a insulina mostrou-se eficaz na preservação da motilidade espermática quando relacionado ao controle. Não houve efeito dos tratamentos instituídos dentro do grupo de alta congelabilidade para motilidade total.

A adição da insulina se mostrou eficaz na preservação da motilidade progressiva dos espermatozoides (Figura 3, B). A categoria de alta congelabilidade apresentou maior valor percentual de células móveis progressivas quando comparado ao de baixa ($p \leq 0,001$). O tratamento insulina foi eficiente na manutenção da motilidade progressiva para categoria de congelabilidade baixa quando comparado ao controle e ao IGF-I ($p \leq 0,05$).

A velocidade de trajeto (VAP) foi maior para animais de alta congelabilidade ($p \leq 0,001$). Pode-se observar que o tratamento insulina obteve menor perda de VAP após a criopreservação em relação aos demais tratamentos para categoria de baixa congelabilidade (Figura 3, C). O grupo de alta congelabilidade apresentou maior VCL e ALH em relação ao grupo de baixa congelabilidade. Não houve efeito da suplementação da insulina e do IGF-1 para as características tais como: VSL, STR, LIN, WOB e BCF ($p \geq 0,05$ Tabela 06).

Figura 3- Média ($\pm$ erro padrão) das características espermáticas da motilidade (CASA) para sêmen criopreservado de touros de alta e baixa congelabilidade nos diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina (INS)

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Pontos com letras minúsculas (a e b) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do tratamento. Pontos com letras maiúsculas (A e B) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do grupo. Asterisco sobrescrito (*) indicam tendência de diferença estatística ($P \leq 0,1$)

Legenda: Painel A: Motilidade subjetiva. Painel B: Motilidade total. Painel C: Motilidade progressiva. Painel D: VAP ($\mu\text{m/s}$): Velocidade do trajeto. Probabilidade para efeito de tratamento (T), congelabilidade (G) e interação tratamento x congelabilidade (TG) que apresentaram diferença estatística significativa ou tendência estão apresentados.

Tabela 5- Média ($\pm$ erro padrão) das características espermáticas da motilidade avaliada pelo sistema CASA (VCL, VSL, STR, WOB, ALH e BCF) para sêmen criopreservado de touros de alta e baixa congelabilidade nos diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina

Características espermáticas								
	Tratamento	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	STR (%)	LIN (%)	WOB (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Alta	Controle	86,64 $\pm$ 2,46	50,06 $\pm$ 1,85	75,89 $\pm$ 1,32	58,81 $\pm$ 1,28	75,34 $\pm$ 1,17	2,90 $\pm$ 0,11	8,49 $\pm$ 0,18
	IGF	86,41 $\pm$ 2,47	52,73 $\pm$ 1,88	80,12 $\pm$ 0,90	63,39 $\pm$ 1,07	77,77 $\pm$ 0,64	2,73 $\pm$ 0,05	8,54 $\pm$ 0,14
	INS	86,03 $\pm$ 2,45	50,06 $\pm$ 1,85	75,89 $\pm$ 1,32	58,81 $\pm$ 1,07	75,34 $\pm$ 1,17	2,90 $\pm$ 0,11	8,49 $\pm$ 0,18
Baixa	Controle	81,57 $\pm$ 2,67	49,91 $\pm$ 2,24	76,76 $\pm$ 1,31	60,10 $\pm$ 1,53	76,64 $\pm$ 0,99	2,71 $\pm$ 0,10	8,63 $\pm$ 0,21
	IGF	81,62 $\pm$ 2,68	49,94 $\pm$ 2,25	76,77 $\pm$ 1,31	60,11 $\pm$ 1,53	76,64 $\pm$ 0,99	2,71 $\pm$ 0,11	8,64 $\pm$ 0,22
	INS	81,74 $\pm$ 2,68	50,06 $\pm$ 2,25	76,81 $\pm$ 1,32	60,18 $\pm$ 1,54	76,72 $\pm$ 0,98	2,72 $\pm$ 0,11	8,66 $\pm$ 0,22
Efeitos principais								
Tratamento								
	Controle	63,69 $\pm$ 2,14	61,55 $\pm$ 2,11	67,24 $\pm$ 1,51	67,68 $\pm$ 1,54	38,52 $\pm$ 4,13	5,58 $\pm$ 0,34	8,34 $\pm$ 0,16
	IGF	83,94 $\pm$ 1,92	50,64 $\pm$ 1,43	77,02 $\pm$ 0,77	60,19 $\pm$ 0,82	76,54 $\pm$ 0,73	2,77 $\pm$ 0,07	8,57 $\pm$ 0,12
	INS	86,08 $\pm$ 1,65	50,87 $\pm$ 1,38	76,27 $\pm$ 0,79	59,87 $\pm$ 0,80	75,43 $\pm$ 0,79	2,85 $\pm$ 0,07	8,72 $\pm$ 0,12
Grupos								
	Alta	86,32 $\pm$ 1,43 ^a	50,31 $\pm$ 1,09	76,05 $\pm$ 0,77	59,06 $\pm$ 0,76	75,50 $\pm$ 0,68	2,89 $\pm$ 0,06 ^a	8,46 $\pm$ 0,10
	Baixa	81,57 $\pm$ 1,54 ^b	49,91 $\pm$ 1,26	76,76 $\pm$ 0,73	60,10 $\pm$ 0,86	76,64 $\pm$ 0,55	2,71 $\pm$ 0,05 ^b	8,63 $\pm$ 0,11
Probabilidades								
	Tratamento	0,15	0,27	0,63	0,43	0,57	0,64	0,13
	Grupo	0,0028	0,32	0,61	0,10	0,19	0,012	0,32
	Interação	0,17	0,17	0,24	0,99	0,32	0,23	0,40

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Pontos com letras minúsculas (a e b) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do grupo em coluna

Legenda: VCL: Velocidade curvilínea. VSL: Velocidade progressiva STR: Retilinearidade. LIN: Linearidade. WOB: oscilação. ALH: deslocamento lateral da cabeça. BCF: Frequência do batimento. Os dados estão apresentados de acordo com cada categoria e seus efeitos principais dentro de tratamento e de grupo. As probabilidades para efeito de tratamento, congelabilidade e interação tratamento x congelabilidade estão apresentados.

4.5.1.2 Membrana plasmática

Houve interação tratamento x congelabilidade para a integridade de membrana plasmática ($p \leq 0,001$, Figura 4). Pode-se observar que os animais de alta congelabilidade apresentaram maior percentual de membranas plasmáticas íntegras do que os animais de baixa congelabilidade. Para categoria de baixa congelabilidade os tratamentos instituídos, desenvolveram maior proteção às membranas das células espermáticas, com destaque a insulina que apresentou maior valor de células íntegras em relação ao grupo controle e ao IGF. Observou-se que o tratamento insulina foi mais eficiente para a preservação da membrana quando comparado aos demais grupos.

Figura 4- Média ($\pm$ erro padrão) da membrana plasmática avaliadas pela citometria de fluxo para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade nos diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Pontos com letras minúsculas (a e b) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do tratamento

Pontos com letras maiúsculas (A e B) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do grupo

Legenda: PI %: integridade de membrana plasmática. Probabilidade para efeito de tratamento (T), congelabilidade (G) e interação tratamento x congelabilidade (TG) que apresentaram diferença estatística significativa estão apresentados.

4.5.1.3 Membrana acrossomal

Na figura 5, é possível notar interação entre tratamento x congelabilidade ($p \leq 0,001$). Como era esperado, o grupo de congelabilidade alta apresentou maior integridade acrossomal do que os de baixa. O tratamento insulina foi mais eficiente na preservação do acrossoma quando comparado ao controle e IGF. Foi possível atestar para o grupo de baixa congelabilidade a ação da insulina na preservação do acrossoma após a congelação, apresentando maior percentual de células com acrossomas íntegros em relação ao controle e ao IGF e foi possível verificar ação positiva do IGF em relação ao grupo controle.

Figura 5- Média ($\pm$ erro padrão) da membrana acrossomal avaliadas pela citometria de fluxo para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade nos diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Pontos com letras minúsculas (a e b) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do tratamento

Pontos com letras maiúsculas (A e B) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do grupo

Legenda: AI %: integridade do acrossoma. Probabilidade para efeito de tratamento (T), congelabilidade (G) e interação tratamento x congelabilidade (TG) que apresentaram diferença estatística significativa estão apresentados.

4.5.1.4 Peroxidação lipídica e estabilidade (fluidez) das membranas

Os resultados para peroxidação lipídica e estabilidade (fluidez) das membranas estão apresentados na tabela 06. Não houve interação entre tratamento x congelabilidade. Quando avaliado o efeito individual foi encontrada diferença entre os tratamentos para as duas características. O grupo que recebeu insulina apresentou menor peroxidação lipídica quando comparado ao controle e ao IGF ($p \leq 0,0001$). Para avaliação da desordem das membranas pela Merocianina, foi possível verificar que o tratamento insulina diminuiu a desordem lipídica, aumentando a estabilidade das membranas, diferindo do grupo controle e IGF ($p \leq 0,0001$).

Tabela 6- Média ($\pm$ erro padrão) para peroxidação lipídica e desordem da membrana plasmática avaliadas pelo citômetro de fluxo para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade tratados com diferentes tratamentos: controle, IGF-I e insulina

Características espermáticas			
Grupos	Tratamento	Peroxidação Lipídica (U.A)	Desordem da Membrana (U.A)
Alta	Controle	679,46 $\pm$ 25,20	6713,55 $\pm$ 403, 46
	IGF	632,40 $\pm$ 26,00	7126,57 $\pm$ 389,04
	INS	561,31 $\pm$ 23,00	5747,85 $\pm$ 346,42
Baixa	Controle	696,02 $\pm$ 34,12	7147,48 $\pm$ 484,22
	IGF	644,76 $\pm$ 27,85	7266,78 $\pm$ 479,37
	INS	555,72 $\pm$ 25,56	5414,71 $\pm$ 365,52
Efeitos principais			
Tratamento	Controle	687,53 $\pm$ 21,28 ^a	6924,96 $\pm$ 317,28 ^a
	IGF	638,42 $\pm$ 19,16 ^a	7194,88 $\pm$ 306,42 ^a
	INS	558,58 $\pm$ 17,41 ^b	5585,55 $\pm$ 253,88 ^b
Grupo	Alta	615,52 $\pm$ 14,51	6504,96 $\pm$ 226,21
	Baixa	629,99 $\pm$ 17,18	6483,09 $\pm$ 277,60
Probabilidades			
Probabilidades	Tratamento	<.0001	0.0001
	Grupo	0.7297	0.7820
	Interação	0.9128	0.6263

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Pontos com letras minúsculas (a e b) diferem estatisticamente ($P \leq 0,05$) dentro do tratamento em coluna

Legenda: U. A= intensidade de fluorescência. Os dados estão apresentados de acordo com cada categoria e seus efeitos principais dentro de tratamento e de grupo. As probabilidades para efeito de tratamento, congelabilidade e interação tratamento x congelabilidade estão apresentados.

4.5.2 Experimento 2: Suplementação de insulina para a criopreservação de sêmen de touros de alta e baixa congelabilidade sobre a fertilidade na IATF em vacas Nelore

4.5.2.1 Motilidade espermática

Houve interação tratamento x congelabilidade para motilidade subjetiva ($p \leq 0,05$). Os animais de alta congelabilidade após a criopreservação apresentaram maior percentual da motilidade espermática do que os de baixa. A insulina foi mais efetiva na preservação da motilidade quando comparado aos demais grupos. A insulina para os animais de baixa congelabilidade teve a menor perda da motilidade espermática quando comparado ao controle (Tabela 08).

Para as características analisadas pelo sistema CASA, não houve interação entre tratamento x congelabilidade. Quando avaliado o efeito individual foi encontrada diferença entre alta e baixa congelabilidade para as características: motilidade total ($p \leq 0,05$), motilidade progressiva ($p \leq 0,05$), VCL ($p \leq 0,05$) e VAP ($p \leq 0,01$). As demais características da motilidade: VSL, LIN STR, WOB, ALH e BCF não mostraram interação entre tratamento e congelabilidade, e quando os efeitos individuais foram comparados também não foram encontradas diferenças nos tratamentos utilizados ($p \geq 0,05$, tabela 08).

Tabela 7- Média ($\pm$ erro padrão) para as características de motilidade espermática (subjetiva, CASA) para sêmen criopreservados de touros de alta e baixa congelabilidade controle e tratados com insulina utilizados na IATF

Características espermáticas												
	Tratamento	MS (%)	MT (%)	MP (%)	VCL (μ m/s)	VSL (μ m/s)	VAP (μ m/s)	LIN (%)	STR (%)	WOB (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)
Alta	Controle	60,83 $\pm 1,53^{Aa}$	80,89 $\pm 2,02$	70,92 $\pm 1,51$	78,06 $\pm 3,32$	41,18 $\pm 3,61$	60,19 $\pm 1,77$	53,70 $\pm 5,60$	67,10 $\pm 4,85$	76,99 $\pm 3,09$	2,61 $\pm 0,26$	8,26 $\pm 0,31$
	INS	60,83 $\pm 1,53^{Aa}$	81,64 $\pm 3,83$	69,84 $\pm 4,04$	77,82 $\pm 3,77$	42,94 $\pm 4,01$	42,94 $\pm 4,01$	56,13 $\pm 6,24$	68,30 $\pm 5,78$	77,80 $\pm 2,57$	2,46 $\pm 0,27$	8,09 $\pm 0,28$
Baixa	Controle	47,50 $\pm 2,50^{Bb}$	62,46 $\pm 5,98$	50,15 $\pm 5,17$	70,12 $\pm 3,12$	39,71 $\pm 2,91$	52,36 $\pm 3,35$	55,38 $\pm 3,74$	72,56 $\pm 2,47$	73,06 $\pm 3,03$	2,47 $\pm 0,15$	8,67 $\pm 0,28$
	INS	56,66 $\pm 2,10^{Aa}$	69,64 $\pm 4,51$	56,13 $\pm 4,35$	71,72 $\pm 2,84$	38,26 $\pm 1,53$	55,22 $\pm 3,18$	58,78 $\pm 2,55$	70,27 $\pm 2,26$	74,66 $\pm 1,17$	2,48 $\pm 0,09$	8,55 $\pm 0,40$
Efeitos principais												
Tratamento												
Controle		54,16 $\pm 2,44$	71,67 $\pm 4,09$	60,54 $\pm 4,05$	74,09 $\pm 2,48$	40,44 $\pm 2,22$	56,27 $\pm 2,16$	54,54 $\pm 3,22$	69,83 $\pm 2,72$	75,02 $\pm 2,14$	2,54 $\pm 0,14$	8,46 $\pm 0,21$
INS		58,75 $\pm 1,38$	75,64 $\pm 3,35$	62,98 $\pm 3,50$	74,77 $\pm 2,43$	40,60 $\pm 2,16$	58,15 $\pm 1,90$	57,45 $\pm 3,24$	69,28 $\pm 2,97$	76,23 $\pm 1,41$	2,47 $\pm 0,13$	8,33 $\pm 0,24$
Grupos												
Alta		60,83 $\pm 1,03$	81,26 $\pm 2,07^A$	70,38 $\pm 2,06^A$	77,94 $\pm 2,40^A$	42,06 $\pm 2,58$	60,63 $\pm 1,13^A$	54,91 $\pm 4,01$	67,70 $\pm 3,60$	77,39 $\pm 1,93$	2,53 $\pm 0,18$	8,17 $\pm 0,20$
Baixa		52,08 $\pm 2,08$	66,05 $\pm 3,73^B$	53,14 $\pm 3,34^B$	70,92 $\pm 2,02^B$	38,99 $\pm 1,58$	53,79 $\pm 2,24^B$	57,08 $\pm 2,22$	71,41 $\pm 1,63$	73,86 $\pm 1,56$	2,48 $\pm 0,08$	8,61 $\pm 0,23$
Probabilidades												
Tratamento		0,03	0,37	0,54	0,77	0,96	0,46	0,54	0,89	0,64	0,72	0,66
Grupo		0,0002	0,002	0,0004	0,03	0,34	0,01	0,65	0,37	0,18	0,84	0,19
Interação		0,03	0,46	0,38	0,29	0,61	0,64	0,91	0,67	0,88	0,56	0,94

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Letras minúsculas (a e b) em coluna significam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre tratamento. Letras maiúscula (A e B) em coluna significam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre grupo. Legenda: MS: Motilidade subjetiva. MT: Motilidade total. MP= Motilidade progressiva. VCL= Velocidade curvilínea. VSL= Velocidade retilínea. VAP= Velocidade média do trajeto. STR= Retilinearidade. LIN= Linearidade. WOB= oscilação ALH= Amplitude de deslocamento lateral de cabeça. BCF= Frequência da batida cruzada. As probabilidades para efeito de tratamento, congelabilidade e interação tratamento x congelabilidade estão apresentados.

4.5.2.2 Membranas espermáticas

As membranas espermáticas não apresentaram interação entre tratamento e congelabilidade. Após, o estudo individual dos efeitos foi observada diferença entre a congelabilidade ($p \leq 0,05$). Os animais de alta congelabilidade apresentaram os mais altos percentuais de integridade de membrana plasmática (IP), alto potencial de membrana mitocondrial (HPM) e de espermatozoides com integridade da membrana plasmática e acrossomal e alto potencial da membrana mitocondrial (PIAIHP). Houve uma tendência do tratamento insulina ter maior potencial de membrana mitocondrial quando comparado ao controle. Para integridade do acrossoma não foi encontrada interação tão pouco efeito individual (tabela 09).

Tabela 9- Média ($\pm$ erro padrão) para a integridade de membranas plasmáticas (PIAHP, IP, AI, HMP) para sêmen criopreservados touros de alta e baixa congelabilidade tratados com insulina utilizados na IATF

Grupos	Tratamento	IP (%)	AI (%)	HPM (%)	PIAIHP (%)
Alta	Controle	56,83 $\pm$ 1,93	72,66 $\pm$ 2,44	69,33 $\pm$ 2,94	55,5 $\pm$ 1,81
	INS	64,41 $\pm$ 4,80	77,58 $\pm$ 5,33	78,58 $\pm$ 3,70	63,5 $\pm$ 5,93
Baixa	Controle	48,25 $\pm$ 3,68	72,41 $\pm$ 3,89	57,83 $\pm$ 5,08	47,58 $\pm$ 3,76
	INS	52,5 $\pm$ 3,77	74,33 $\pm$ 2,62	65,58 $\pm$ 5,48	52,16 $\pm$ 3,78
Efeitos principais					
Tratamento	Controle	52,54 $\pm$ 2,37	72,54 $\pm$ 2,19	63,58 $\pm$ 3,29 ^B	51,54 $\pm$ 2,32
	INS	58,45 $\pm$ 3,75	75,95 $\pm$ 2,87	72,08 $\pm$ 3,71 ^A	57,83 $\pm$ 3,76
Grupo	Alta	60,62 $\pm$ 3,13 ^A	75,12 $\pm$ 2,89	73,95 $\pm$ 2,65 ^A	59,5 $\pm$ 3,19 ^A
	Baixa	50,37 $\pm$ 2,63 ^B	73,37 $\pm$ 2,25	61,70 $\pm$ 3,75 ^B	49,87 $\pm$ 2,63 ^B
Probabilidades					
Probabilidades	Tratamento	0,15	0,36	0,06*	0,13
	Grupo	0,01	0,63	0,01	0,02
	Interação	0,68	0,68	0,86	0,68

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Letras maiúscula (A e B) em coluna significam diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre grupo e tratamento.

Legenda: IP= células com membrana plasmática íntegra. AI= células com acrossoma íntegro. HMP= células com potencial mitocondrial. PIAIHP= células com membrana plasmática e acrossomal íntegros com potencial mitocondrial. As probabilidades para efeito de tratamento, congelabilidade e interação tratamento x congelabilidade estão apresentados.

4.5.2.3 Taxa de prenhez

A média geral da taxa de prenhez foi de 47,45% (1022/485). A adição de insulina (150 μ UI/mL) no diluidor do sêmen criopreservado não influenciou na taxa de prenhez após a IATF (Figura 6, A). Quando comparado dentro de tratamento, controle (513/248) e insulina (509/237) não diferiram em relação a taxa de prenhez (Figura 6, B). Ademais, quando feita a comparação entre grupos de congelabilidade não foi verificada diferença na taxa de prenhez para as vacas que receberam sêmen de touros de alta congelabilidade (509/243) para sêmen de baixa congelabilidade (513/242) na IATF (Figura 6, C).

Figura 6- Média ($\pm$ erro padrão) da taxa de prenhez de fêmeas após a IATF utilizando sêmen criopreservado com insulina de touros de alta e baixa congelabilidade

Fonte: Pinto (2020).

Nota: Não houve diferença estatística ($P > 0,05$)

Legenda: Os dados estão apresentados de acordo com cada categoria e seus efeitos principais dentro de tratamento e de grupo. As probabilidades para efeito de tratamento (T), congelabilidade (G) e interação tratamento x congelabilidade (TG) estão apresentados.

4.6 Discussão

A qualidade do sêmen criopreservado é essencial para o sucesso da inseminação artificial (DUARTE-JUNIOR et al., 2015), pois é notório seu grande impacto sobre a prenhez (NOGUEIRA et al., 2019). Após a criopreservação, os espermatozoides precisam manter motilidade e ter duração suficiente para penetrar o oócito após a inseminação (CELEGHINI et al., 2017). Contudo, o processo de congelar e descongelar danifica as células espermáticas devido a mudanças de temperatura, produção de espécies reativas de oxigênio, que afetam principalmente as membranas e a integridade do DNA, culminando com a diminuição da motilidade, viabilidade das células e, conseqüentemente, diminuição da fertilidade (GURLER et al., 2016). Além disso, há diferenças individuais na resistência ao processo de criopreservação entre os animais (RONCOLETTA et al., 2013), assim foi instituído o uso de IGF-I e insulina com o objetivo de preservação das células espermáticas após a criopreservação.

Os touros de alta congelabilidade apresentaram maiores valores para as características da motilidade, velocidade espermática, integridade de membranas após a descongelação, configurando maior resistência a congelação, como evidenciado por Ruy et al. (2019) que descreveram que os animais de alta congelabilidade mantêm mais facilmente sua motilidade e integridade das membranas do que um grupo com baixa congelabilidade, assim a criotolerância espermática é diferente entre os touros.

Neste estudo, foi possível verificar que a adição de insulina ao diluidor foi eficaz em melhorar a preservação das células espermáticas após criopreservação, sendo comprovada pelas características de motilidade subjetiva, motilidade total, motilidade progressiva e pela velocidade de trajeto, principalmente para o grupo de baixa congelabilidade, na qual o efeito da insulina foi evidente. Esses achados indicam que a insulina foi efetiva na preservação da motilidade espermática, corroborando os relatos de Carpino et al. (2010) a respeito da secreção de insulina e a expressão de seus receptores na região acrossomal e da peça intermediária nos espermatozoides de suínos. Esses mesmos autores aderiram à insulina, devido a sua localização nos espermatozoides, o papel fundamental no movimento da célula espermática por meio de um sistema autócrino, com ligação no seu receptor, presente na peça

intermediária na indução de energia ao espermatozoide. Aquila et al. (2005) mencionam que a diluição do sêmen realizada para criopreservação diminui as concentrações de insulina, fazendo com que a célula espermática fique mais exposta, requerendo, maior mobilização das suas reservas. Assim, o grupo que recebeu insulina supriu a necessidade requerida, conseqüentemente, teve melhor preservação das células espermáticas durante a criopreservação, culminando com o maior percentual de motilidade espermática.

Além disso, a insulina adicionada ao diluente pode ter aumentado a captação de glicose pela substituição das proteínas de transporte da glicose, que provavelmente são perdidas durante o processo da congelação, fornecendo mais substrato para manutenção da atividade flagelar, o mesmo descrito por Padilha et al. (2012). Recente pesquisa em humanos também evidenciou uma resposta positiva na adição da insulina ao meio de congelação, demonstrando que as diferentes concentrações (10, 100, 500 e 1000 ng/mL) acrescidas ao diluente no meio de criopreservação, aumentou o número de células móveis quando comparada ao controle (SHOKRI et al., 2019), fortalecendo os resultados obtidos.

A membrana plasmática dos espermatozoides é uma das estruturas mais sensíveis ao processo de congelação (SILVA e GUERRA., 2011). Como foi mencionado, anteriormente, o espermatozoide tem a capacidade de mobilizar a insulina de seus grânulos durante a capacitação, desencadeando maior suprimento de energia para a célula espermática que irá desestabilizar os componentes mantendo a integridade das membranas plasmática e acrossomal durante o processo de criopreservação (AQUILA et al., 2005), o que justifica nossos achados, pois o tratamento com insulina apresentou maior número de células com membrana plasmática íntegra e acrossomo intacto, sendo estes efeitos mais evidentes nos animais de baixa congelabilidade, novamente, com maior preservação das membranas plasmática e acrossomal em relação ao controle e ao IGF. Van Tilburg et al. (2008) relatam que a insulina atua protegendo o acrossoma durante a congelação, através da inibição da ligação do AMPc à proteína quinase dependente ao AMPc e ativação da fosfatidil-inositol 3-,4-bisfosfato e fosfatidil-inositol 3,4,5-trifosfato, mecanismos responsáveis pela capacitação e reação acrossômica. A integridade do acrossoma, além da resposta da insulina, apresentou efeito positivo do IGF-I durante a

criopreservação para os animais de baixa congelabilidade, dados que corroboram os de Resende et al. (2019), que observaram que a adição de IGF-I ao sêmen refrigerado melhorou a integridade do acrossoma em estudo com sêmen de suíno. Esse efeito do IGF-I pode ser atribuído a sua ação antioxidante como relatada por Selvaraju et al. (2009, 2016) e a ligação do IGF-I com seus receptores presentes nas membranas acrossomais (HENRICKS et al., 1998).

É notório que durante a criopreservação do sêmen, que as membranas plasmáticas, devido à grande quantidade de ácidos graxos insaturados, são susceptíveis a ação das ROS, culminando com peroxidação lipídica (AGARWAL et al., 2018). Isso ocorre quando as ROS abstraem um átomo de hidrogênio das cadeias de ácidos graxos insaturados, presentes em grandes quantidades nos espermatozoides (HALLIWELL; GUITTERIDGE, 1999) e altera a composição, a estrutura e a dinâmica das membranas (GASCHLER; STOCKWELL, 2017). De acordo com os resultados, o sêmen tratado com insulina teve menor peroxidação lipídica do que os outros grupos, demonstrando a proteção da insulina aos efeitos nocivos das ROS nas células espermáticas durante a congelação, esse efeito pode ser atribuído devido a ligação da insulina com seus receptores presentes nas membranas dos espermatozoides (RAINS; JAIN, 2011), atribuindo nas funções da insulina o efeito antioxidante, descrito pela primeira vez, em sêmen bovino criopreservado. Estudo com sêmen criopreservado de humanos, encontrou igual resposta da ação antioxidante da insulina utilizando a concentração de 10 ng/mL, os autores notaram redução da produção de ROS quando comparado ao controle (SHOKRI et al., 2019).

A criopreservação do sêmen altera a fluidez da bicamada da membrana, culminando com o agrupamento dos fosfolipídios semelhantes e exclusão das proteínas da membrana, diminuindo a mobilidade e funcionalidade das membranas (JASKO, 1994). O acréscimo da insulina ao diluente apresentou menor emissão de fluorescência da Merocianina, ou seja, menor desordem das membranas que significa aumento da estabilidade. De acordo com Rathi et al. (2001), a Merocianina cora com mais intensidade as células espermáticas íntegras com componentes lipídicos em elevado nível de desordem, assim, em espermatozoides capacitados. Dessa forma, o sêmen tratado com insulina mostrou menor criocapacitação espermática. Van Tilburg et al. (2008) descrevem que a baixa concentração de insulina nos diluentes utilizados na

criopreservação do sêmen está associada com o maior número de espermatozoides capacitados. Partindo desse pressuposto, a concentração da insulina presente no plasma seminal é diluída durante o processo de congelamento, o que pode acarretar a ativação do mecanismo precoce da capacitação. Assim a insulina, segundo esses autores, contribui como fator de preservação do estado não capacitado, corroborando os achados do presente estudo.

Geralmente, os testes *in vitro* são usados para determinar a qualidade do sêmen antes de serem utilizados nas inseminações, estes apresentam uma correlação positiva entre a qualidade do sêmen e a fertilidade *in vivo*; contudo, apesar da correlação existente, esses testes não são capazes de prever a capacidade fecundante dos espermatozoides como os testes *in vivo* (KASTELIC; THUNDATHIL, 2008). Dessa forma, após os resultados anteriores obtidos no estudo atual, foi avaliado o efeito da insulina na fertilidade a campo.

A média geral da taxa de prenhez foi de 47,45% valores que estão de acordo com o descrito pelo GERAR (2019). Observou-se que a adição de insulina ao diluidor de criopreservação de sêmen não melhorou a taxa de prenhez após a IATF quando comparado ao controle. Era esperado que adição de insulina provocasse um efeito positivo, com aumento da taxa de prenhez, principalmente quando adicionada ao sêmen de touros de baixa congelabilidade suplementados com insulina, uma vez que a mesma age indiretamente sobre a via da pentose fosfato (PPP), através da regulação da enzima G6PDH, resultando na produção de NADPH, que por sua vez, irá agir nos eventos relacionados com a capacidade do espermatozoide de se ligar-se ao oócito (AQUILA et al., 2005), baseando-se nos testes do presente estudo, pois a insulina atuou preservando a motilidade espermática, integridade de membranas, diminuiu a peroxidação e aumentou a estabilidade das membranas.

A taxa de prenhez para vacas que foram inseminadas com sêmen de alta congelabilidade não foi superior do que os animais que receberam sêmen de baixa congelabilidade (45,99% vs 45,51%), sendo que o sêmen de alta apresentou maiores valores para as características da motilidade e integridade de membranas. Apesar, do grupo de baixa congelabilidade apresentar menor percentual para as características espermáticas analisadas, a porcentagem média de espermatozoide com motilidade espermática apresentava-se alta (52,08%), uma vez que o recomendado para sêmen pós-descongelamento é de

valores $\geq 30\%$, segundo o CBRA (2013). Os resultados obtidos para os parâmetros analisados pelo CASA, a motilidade espermática total e a motilidade progressiva para o sêmen de alta e baixa congelabilidade estão superiores ao encontrado por Cojkić et al. (2017) em sêmen bovino criopreservado, com 56,69 e 32% para as motilidades respectivamente, e esses autores descrevem uma taxa de prenhez de 38% na utilização desse sêmen, abaixo do encontrado no presente estudo. Oliveira et al. (2014) relatam valores de 44,5% de PIAIH para touros de boa fertilidade, dados inferiores dos achados atuais para ambas as categorias, ressaltando que não houve diferença em relação a integridade do acrossomo para alta e baixa congelabilidade com valores acima de 70%, o que pode responder ao não impacto da congelabilidade na fertilidade testada a campo.

4.7 Conclusão

Pode-se concluir com este estudo que a insulina adicionada aos diluidores de criopreservação de sêmen foi capaz de preservar melhor a motilidade espermática, integridade da membrana plasmática e acrossomal, diminuir a peroxidação lipídica e aumentar a estabilidade das membranas, principalmente em animais de baixa congelabilidade; entretanto, o uso de sêmen criopreservado com adição de insulina não influencia a taxa de prenhez.

Referências

- ABUD, C. O. G.; ABUD, L. J.; OLIVEIRA-NETO, J. C.; DODE, M. A. N.; SERENO, J. R. B.; MARTINS, C. F. Comparação entre os sistemas automatizado e convencional de criopreservação de sêmen bovino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 15, p. 32-37, 2014.
- AGARWAL, A. ; RANA, M. ; QIU, E.; ALBUNI, H.; BUI, A. D.; HENKEL, R. Role of oxidative stress, infection and inflammation in male infertility. **Andrologia**, v. 50, n. 11, p. 5-13, 2018.
- ALMQUIST, J.O.; WIGGINS, H.B. Survival of bull spermatozoa frozen and thawed by different methods in plastic straws. **A. I. Digest.**, v. 21, n. 7, p.1-12, 1973.
- ALVAREZ, J. G.; STOREY, B. Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm 483 during cryopreservation. **Journal Andrology**, v.13, n. 3, p. 232–41, 2008.
- AMIDI, F.; PAZHOHAN, A.; NASHTAEI, M. S.; KHODARAHMIAN, M.; NEKOONAM, S. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. **Cell Tissue Bank**, v. 17, n. 4, p. 745-756, 2016.
- 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.
- ANTON, M.; GANDEMER, G. Composition, solubility and emulsifying properties of granules and plasma of egg yolk. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 3, 484-487, 1997.
- AQUILA, S.; GENTILE, M.; MIDDEA, E.; CATALANO, S.; ANDÒ, S. Autocrine regulation of Insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. **Endocrinology**, v.146, n. 2, p. 552-55, 2005.
- AQUILA, S.; GIORDANO, F.; GUIDO, C.; RAGO, V.; CARPINO, A. Insulin Affects Sperm Capacity in Pig Through Nitric Oxide. **Asian Journal of Andrology**, v. 15, n. 6, p. 835-837, 2013.

ARAÚJO, M. A. S. Plasma seminal (Revisão). **PUBVET**, v.8, n.18, p. 2173-2291, 2014.

ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; PERES, K. R.; RAPHAEL, C. F.; NASCIMENTO, J.; CELEGHINI, E. C. C. Biotécnicas aplicadas à avaliação do potencial de fertilidade do sêmen equino. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.31, p.8-16, 2007.

Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carne. Exportação de Carne Bovina do Brasil. Disponível em: <http://www.abiec.org.br/ExportacoesPorAno.aspx> Acesso em: 02/10/2019.

AURICH, J.E.; SCHONHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, n. 2, p. 185-192, 1997.

AYRES, H.; FERREIRA, R. M.; TORRES-JÚNIOR, J. R. S.; DEMÉTRIO, C. G. B.; LIMA, C. G.; BARUSELLI, P. S. Validation of body condition score as a predictor of subcutaneous fat in Nelore (*Bos indicus*) cows. **Livestock Science**, v. 123, n. 2-3, p. 175-179, 2009.

BACCETTI, B.; LA MARCA, A.; PIOMBONI, P.; CAPITANI, S.; BRUNI, E.; PESTRAGLIA, F.; DE LEO, V. 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.

BANDAY, M. N.; LONE, F. A.; RASSOL, F.; RASHID, M.; SHIKARI, A. Use of antioxidants reduce lipid peroxidation and improve quality of crossbred ram sperm during its cryopreservation. **Cryobiology**, v. 74, p. 25-30, 2017.

BARUSELLI, P. S. Avaliação do mercado de IATF no Brasil (2019). **Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP**, 3ªed., 2020. Acesso <<http://vra.fmvz.usp.br/boletim-eletronico-vra/>>

BARUSELLI, P. S.; FERREIRA, R. M.; SÁ FILHO, M. F.; BÓ, G. A. Review: Using artificial insemination v. natural service in beef herds. **Animal**, v. 12, p. 45-52, 2018.

BARUSELLI, P.S.; CATUSSI, B. L.C; ABREU, L.A; ELLIFF F.M.; SILVA, L.G.; BATISTA, E.S.; CREPALDI, G.A. Evolution and perspectives of timed artificial insemination in cattle. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, p. 308-314, 2019.

BAVISTER, D.; LORRAINE, M. Development of Preimplantation in a Defined Embryos of the Golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, v. 28, n. 1, p. 235–247, 1983.

BENSON, J. D.; WOODS, E. J.; WALTERS, E. M.; CRISTSER, J. K. The cryobiology of spermatozoa. **Theriogenology**, v. 78, n. 8, p. 1682-1699, 2012.

BERKOVITZ A.; ALLOUCHE-FITOUSSI, D.; IZAHAKVOC, D.; BREITBART, H. Cryopreservation of human sperm in the presence of Zinco²⁺ increases the motility rate. **Journal of Obstetrics and Gynecological Investigations**, v.1, p.1-7, 2018.

BIELOHUDY, M.; ZARKESH-ESFAHANI, S. H.; MANOLOPOULOU, J.; WINTHGEN, E.; WALPURGIS, K.; KHORASGANI, M. T.; AGHILI, Z.S.; WILKINSON, I.R.; HOEFELIC, A.; THEVIS, M.; ROSSO, R.; BIDLINGMAIER, M. Validation of serum IGF-I as a biomarker to monitor the bioactivity of exogenous growth hormone agonists and antagonists in rabbits. **Disease Models & Mechanism**, v. 7, n. 11, p. 1263-1273, 2014.

BITTENCOURT, R. F.; OBA, E.; RIBEIRO-FILHO, A.L.; CHALHOUB, M.; AZEVEDO, H. C.; BICUDO, S. D. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Ciência Animal Brasileira**, v.14, n.4., p. 522-536, 2013.

BLASCHUCK, O.; BURDZY, K.; FRITZ, I. B. Purification and characterization of cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein testis fluid. **Journal of biological chemistry**, v. 258, n. 12, p. 7714-7720, 1983.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bulls Spermogram. **Nordirks Veterinaer Medicin**, v. 25 n. 7, p. 383-391, 1973.

BOJANIC, A. Representante da FAO Brasil apresenta cenário da demanda por alimentos. Site: www.fao.org. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/901168/>. Acesso em: 02 de dezembro de 2019.

BRANDÃO, A.C.; ARRUDA, R.P.; MADUREIRA, E.H.; PANATTONI, J.F.; ASSUMPÇÃO, M.E.; MARTINS, J.A. Influência do glicerol e etilenoglicol e da criopreservação sobre o complexo DNA-Proteína de espermatozoides em garanhões. **Brazil Journal Veterinariae. Res. Animal. Science**, v. 43, p. 68-73, 2006.

BREITBART, H, Signaling pathways in sperm capacitation and acrosome reaction. **Cell Molecular Biology**, v. 49, n. 3, 321–327, 2003.

BUSTAMANTE-FILHO, J. C.; SALTON, G. D.; MUNARI, F. M.; SCHNEIDER, M. R.; MATTOS, R. C.; LAURINO, J. P.; CIRNE-LIMA, E. O.; JOBIM, M. I. M. Recombinant expression and purification of the bovine acidic Seminal Fluid Protein. **Animal Reproduction**, v. 11, n.2, p. 96-103, 2014.

CARPINO, A.; RAGO, V.; GUIDO, C.; CASABURI, I.; AQUILA, S. Insulin and IR-beta in Pig Spermatozoa: A Role of the Hormone in the Acquisition of Fertilizing Ability. **International Journal of Andrology**, v. 33, n. 3, p. 554-562, 2010.

CARVALHEIRA, J. B. C. ZECCHIN, H. G.; SAAD, M. J. A. Vias de sinalização da insulina. *Arquivo Brasileiros de Endocrinologia & Metabolobia*, v. 46, n. 4., 2002.

CBRA, Colégio Brasileiro de Reprodução Animal-. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3.ed. Belo Horizonte: 2013.104p.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C. F.; RODRIGUES, P.H. Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. **Animal Reproduction Science**, v.104, n. 2-4, p. 119-131, 2008.

CELEGHINI, E. C. C.; ARRUDA, R. P.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; SANTOS, F. B.; ALVES, M. B. R.; OLIVEIRA, B. M. M. Impacto da qualidade do sêmen sobre a fertilidade a campo em bovinos. **Revista Brasileira Reprodução Animal** v.41, n.1, p.40-45, 2017.

CEPEA- Centro de Estudos Avançados em economia aplicada. Mercado de trabalho no Agronegócio. Disponível em: <https://www.cepea.esalq.usp.br/br/mercado-de-trabalho-do-agronegocio.aspx> Acesso em: 02/10/2019.

CHAMPION, Z. J.; VICKERS, M. H.; GRAVANCE, C. G.; BREIER, B. H.; CASEY, P. J. Growth hormone or insulin-like growth factor-I extends longevity of equine spermatozoa in vitro. **Theriogenology**, v. 57, n. 7, p. 793-1800, 2002.

CLEMMONS, D.R.; DEHOFF, M.L.; BUSBY, W. Y.; BAYNE, M.L.; CASCIERI, M. A. Competition for binding to insulin-like growth factor (IGF) binding protein-2, 3, 4, and 5 by the IGFs and IGF analogs. **Endocrinology**, v. 131, n.2, p. 890-895, 1992.

COJKIC, A.; DIMITRIJEVIC, V.; SAVIC, M.; JEREMIC, I.; VUKOVIC, D.; COBANIVIC, N.; OBRADOVIC, S.; PETRUJKIC, B. T. The correlation between selected computer assisted sperm analysis parameters and bull fertility. **Veterinarski Arhiv**, v.87, n. 2, p. 129-137, 2017.

COSTA, O. J. S.; ALMEIDA, D.S.; PINTO, S. C. C.; CHAVES, R. M.; LASKOSKI, L. M.; SOUZA, F. A. Insulina e IGF-1 no meio extensor de criopreservação seminal bovina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 3, 664-672, 2020.

DALMAZZO, A.; LOSANO, J. D. A.; ROCHA, C. C.; TSUNODA, R.H.; ANGRIMANI, D. S. R.; MENDES, C.M.; ASSUMPÇÃO, M. E. O. A.; NICHII, M.; BARNABE, V. H. Effects of soy lecithin extender on dog sperm cryopreservation. **Animal Biotechnology**, v. 29, n. 3, p. 174-182, 2018.

DING, G. L.; LIU, M.; PAN, J. X.; GUO, M. X.; SHENG, J. Z.; HUANG, H. F. The effects of diabetes on male fertility and epigenetic regulation during spermatogenesis. **Asian Journal of Andrology**, v.17 n. 6, p. 948–953, 2015.

DOSTALOVA, Z.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; HETTEL, C.; RIEDEL, D.; SCHONECK, C.; EINSPANIER, R.; TOPFER-PETERSEN, E. Immunolocalization and quantitation of acidic seminal fluid protein(aSFP) in ejaculated, swim-up, and capacited bull spermatozoa. **Biological Chemistry Hoppe-Seyler**, v. 375, n. 7, p. 457-461, 1994.

DUARTE JÚNIOR, M. F.; ZERVOUDAKIS, L. K. H.; ZERVOUDAKIS, J. T.; NICHII, M.; BERTOLLA, R. P.; TSUNEDA, P. P.; SENRA E SILVA, L. E.; WINGERT, F. M.; MARINHO, W. A. dos S. Avaliação do tocoferol no congelamento do sêmen bovino e nas taxas de prenhez após inseminação artificial em tempo fixo. **Revista brasileira Ciência Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 114-118, 2015.

EINSPANIER, R.; KRAUSE, I.; TOFFER-PETERSEN, E.; KLOSTERMEYER, H.; KARG, H. Bovine seminal plasma aSFP: localization of disulfide bridges and detection of three different isoelectric forms. **FEBS Letters**, v. 344, n.1, p. 61-64, 1994.

EMERICK, L. L.; DIAS, J. C.; VALE FILHO, V. R. do; SILVA, M. A.; ANDRADE, V. J.; LEITE, T. G.; MARTINS, J. A. M. Avaliação da Integridade de Membrana em Espermatozoide Bovino Criopreservado para Prever o Índice de Prenhez. **Ciência Animal Brasileira**, v.12, n.3, p. 536-546, 2011.

ERIKSON, D. W.; WAY, A. L.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, v.133 n. 5, p. 909-917, 2007.

GARCIA, B. M.; FERNANDEZ, L. G.; FERRUSOLA, C. O.; BOLANOS, J. M. G.; MARTINEZ, H.R.; TAPIA, J. A.; MORCUENDE, D.; PENA, F. J. Fatty acids and plasmalogens of the phospholipids of the sperm membranes and their relation with the post- thaw quality of stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v.75, n. 5, 811–818, 2011.

GASCHLER, M. M.; STOCKWELL, B. R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.

GERAR, Grupo Especializado em Reprodução Aplicada ao Rebanho, Relatório de IATF, 2019, Disponível em: <https://www.grupogerar.agr.br/dados-gerar-leite/>. Acesso: 21/03/2020.

GIARETTA, E.; MUNERATO, M.; YESTE, M.; GALEATI, G.; SPINACI, M.; TAMANINI, C.; MARI, G.; BUCCI, D. Implementing an open-access CASA software for the assessment of stallion sperm motility: relationship with other sperm quality parameters. **Animal Reproduction Science**, v.176, p.11-19, 2017.

GNESSE, 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**, v.18, n. 4, p. 541-609, 1997.

FORERO-GONZALEZ, R. A.; CELEGHINI, E. C. C.; RAPHAEL, C. F.; ANDRADE, A. F. C.; Bressan, F. F.; ARRUDA, R. P. Effects of bovine sperm

cryopreservation using different freezing techniques and cryoprotective agents on plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Andrologia (Berlin)**, v. 44, p. 154-159, 2012.

GROTTER, L. G.; CATTANEO, L.; MARINI, P. E.; KJELLAND, M. E.; FERRÉ, L. B. Recent advances in bovine sperm cryopreservation techniques with a focus on sperm post-thaw quality optimization. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, n. 4, 655-665, 2019.

GURLER, H.; MALAMA, E.; HEPPELMAMM, M.; CALISICI, O.; LEIDING, C.; KASTELICK, J. P.; BOLLWEIN, H. Effects of cryopreservation on sperm viability, synthesis of reactive oxygen species and DNA damage of bovine sperm, **Theriogenology**, v.86, n. 2, 562-567, 2016.

GWATHMEY, T.M.; IGNOTZ, G.G.; MUELLER, J.L.; MANJUNATH, P.; SUAREZ, S.S. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 4, 501-507, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine, 3rd ed. Oxford: Clarendon Press, 1999.

HENRICKS, D. M.; KOUBA, A. J. K.; LACKEY, B. R.; BOONE, W.R.; GRAY, S. L. Identification of Insulin-Like Growth Factor I in Bovine Seminal Plasma and Its Receptor on Spermatozoa: Influence on Sperm Motility, **Biology of Reproduction**, v.59, n.2, p. 330–337, 1998.

HOWES, E. A.; HURST, S.; LASLOP, A.; JONES, R. Cellular distribution and molecular heterogeneity of MAC393 antigen (clusterin, beta-chain) on the surface membrane of bull spermatozoa. **Molecular Human Reproduction**, v 4, n. 7, p. 673–681 1998.

ICER, M. A.; GEZMEN-KARADAG, M. The multiple functions and mechanisms of osteopontina. **Clinical Biochemistry**, v. 59, p. 17-24, 2018.

INCALZA, M. A.; DÓRIA, R.; NATALICCHIO, A.; PERRINI, S.; LAVIOLA, L.; GIOGINO, F. Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. **Vascular Pharmacology**, v. 100, p. 1-9, 2018.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Sistema de Recuperação Automática (SIDRA). Efetivo do rebanho brasileiro, 2018. Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/3939#resultado>. Acesso em: 02/10/2019.

JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinaria**, v.10, p. 156-165, 1994.

JELÍNKOVÁ, P.; MANÁSKOVÁ, P.; TICHÁ, M.; JONÁKOVÁ, V. Proteinase inhibitors in aggregated forms of boar seminal plasma proteins. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 32, n. 3-5, p. 99-107, 2003.

JENNE, D. E.; LOWIN, B.; PEITSCH, M.C.; BOTTCHER, A.; SCHIMITZ, G.; TSCHOPP, J. Clusterin (complement lysis inhibitor) forms a high-density lipoprotein complex with apolipoprotein A-1 in human plasma. **The Journal Biological Chemistry**, v. 266, n.17, p. 11030-11036, 1991.

JIALAL, I.; GRUNDY, S. D. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 669, p. 239-248, 1992.

JOBIM, M. I. M.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Proteínas do plasma seminal relacionadas a congelabilidade do sêmen bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.5, n. 6, p. 25-31, 2009.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; CIMAROSTI, H. I.; MATTOS, R. C. Albumina e osteopontina – Proteínas do plasma seminal bovino relacionadas com a congelabilidade do sêmen. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, v.26, n. 4, p. 296-305, 2002.

JOBIM, M. I. M.; OBERST, E. R.; SALBEGO, C. G.; SOUZA, D. O.; WALD, V. B.; TRAMONTINA, F.; MATTOS, R. C. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. **Theriogenology**, v. 61, n. 2-3, p. 255-266, 2004.

JUNIOR-MARTILELLI, C. E.; CUSTODIO, R. J.; AGUIAR-OLIVEIRA, H. Fisiologia do eixo GH-sistema IGF. **Arquivo Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 5, p. 717-725, 2008.

KASHIR, J.; HEYNEN, A.; JONES, C.; DURRANS, C.; CRAIG, J.; GADEA, J.; TURNER, K.; PARRINGTON, J.; COWARD, K. Effects of cryopreservation and

density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 23, n. 2, p. 263–7, 2011.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding Soundness Evaluation and Semen Analysis for Predicting Bull Fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, V.43, sup. 2, 368-373, 2008.

KERR, J. M.; FISHER, L. W.; TERMINE, J. D.; YOUNG, M. F. The cDNA cloning and RNA distribution of bovine osteopontin. **Gene**, v.108, n. 2, p. 237-43. 1991.

KILLIAN, G. J.; CHAPMAN, D. A.; ROGOWSKI L. A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, v.49, p. 1202-1207,1993.

KOMAMISRUDE, E.; GRAFFER, T.; STEINER, T. Comparison of two processing systems for Bull semen with regard to post thaw motility and nonreturn rates. **Theriogenology**, v. 45, n.8, p. 1515-1521, 1996.

KUMAR, A.; LAXMI, N. A. Role of IGF-1 in male and female reproduction in bovines: a review. **Asia Pacific Journal of Research**, v.1, p. 17-25, 2015.

KUMAR, P.; PAWARIA, S.; DALAL, J.; BHARDWAJ, S.; PATIL, S.; JEROME, A.; SHARMA, R. K. Serum and seminal plasma IGF-1 associations with semen variables and effect of IGF-1 supplementation on semen freezing capacity in buffalo bulls. **Animal Reproduction Science**, v.204, p. 101-110, 2019.

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

LARON, Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. **Molecular Pathology**, v. 54, n. 5, p. 311-316, 2001.

LAYEK, S.S.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean-based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 1-9, 2016.

LEAHY, T.; GRAAF, S. P. Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. **Reproduction Domestic Animal**, v.47, sup. 4, p. 207-213, 2012.

LEE, H. S.; PARK, Y. S.; LEE, J. S.; SEO, J. T. Serum and seminal plasma insulin-like growth factor-1 in male infertility. **Clinical and Experimental reproductive medicine**, v. 43, n. 2, p. 97-101, 2016.

LEJEUNE, H.; CHUZEL, F.; THOMAS, T.; AVALLET, O.; HABERT, R.; DURAND P.; SAEZ, J. Paracrine regulation of Leydig cells. **Annale D'Endocrinologie**, v. 57, n. 1, p. 55-63. 1996.

LEMMA, A. Effect of cryopreservation on sperm quality and fertility. In M. Manafi (Ed.), Artificial insemination in farm animals (pp.191–216). Debre Zeit, Ethiopia: InTech Publisher, InTech Europe, 2011.

LIMA, L. F. D.; MOURA, P.; PASSOS, P. I. V.; LEAL, D. R.; RUMPF, R.; NEVES, J. P. Influência de sistemas de refrigeração sobre a qualidade do sêmen ovino criopreservado em palhetas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 4, p. 835-844, 2010.

LIU, J.; TANRIKUT, C.; WRIGHT, D. L.; LEE, G. Y.; TONER, M.; BIGGERS, J. D.; TOTH, T.L. Cryopreservation of human spermatozoa with minimal non-permeable cryoprotectant. **Cryobiology**, v. 73, n.2, p. 162-167, 2016.

LUZ, V. B.; CHAVES, R. N.; ALVES, A. M. C.; PINHEIRO, A.S.; FIGUEIREDO, J. R. Papel do fator de crescimento semelhante à Insulina – I (IGF-I) kit Ligand (KL) na função ovariana. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 43, 2015.

MACPHERSON, M. L.; SIMMEN, R. C. M.; SIMMEN, F. A.; HERNANDEZ, J.; SHEERIN, B. R.; VARNER, D. D.; LOOMIS, P.; CADARIO, M.; MILLER, C. D.; BRINSKO, S. P.; BLANCHARD, T. L. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 equine seminal plasma: Association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 648-654, 2002.

MAKAREVICH, A.V.; SPALEKOVA, E.; OLEXIKOVA, L.; KUBOVICOVA, E.; HEGEDUSOVA, Z. Effect of insulin-like growth factor I on functional parameters of ram cooled-stored spermatozoa. **Zygote**, v. 22, n. 3, p. 305–313, 2014.

MANJUNATH, P.; LEFEBVRE, J.; JOIS, P. S.; FAN, J.; WRIGHT, M. W. New nomenclature for mammalian BSP genes. **Biology of Reproduction**, v. 80, n.3, p. 394-397, 2009.

MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipids binding proteins. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n.1-2, p. 109-119, 2002.

MAZUR, P.; LEIBO, S.P.; CHU, E.H. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from chinese hamster tissue-culture cells. **Experimental Cell Research**, v. 71, n.2, p. 345-55, 1972.

McCARTHY, M. J.; BAUMBER, J.; KASS, P.H.; MEYERS, S. A. Osmotic stress induces oxidative cell damage to rhesus macaque spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 82, n.3, p. 644–51, 2009.

MEDEIROS, C. M. O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A. T.O.; RODRIGUES, J. L. Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 327 – 344, 2002.

MENEZES, E. B.; OLIVEIRA, R. V.; VAN TILBURG, M. F.; BARBOSA, E. A.; NASCIMENTO, N. V.; VELHO, A. L. M. C. S.; MORENO, F. B.; MOREIRA, R. A.; MONTEIRO-MOREIRA, A. C. O.; CARVALHO, G. M. C.; RAMOS, A. F.; PECHAN, T.; MEMILI, E.; MOURA, A. A. Proteomic analysis of seminal plasma from locally-adapted “Curraleiro P’-e-Duro bulls” (*Bos taurus*): identifying biomarkers involved in sperm physiology in endangered animals for conservation of biodiversity. **Animal Reproduction Science**, v.183, p. 86-101, 2017.

MIAO, Z. R.; LIN, T. K.; BONGSON, T. A.; ZHOU, X.; COHEN, P.; LEE, K. O. Effect of insulin-like growth factors (IGFs) and IGF-binding proteins on in vitro sperm motility. **Clinical Endocrinology**, v.49, n.2, p. 235-239, 1998.

MOURA, A. A.; KOC, H.; CHAPMAN, D.; KILLIAN, G. J. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal Andrology**, v. 27, n. 2, p. 201-211, 2006.

MOURA, A.A.; SOUZA, C. E.; STANLEY, B. A.; CHAPMAN, D. A.; KILLIAN, G. J. Proteomics of cauda epididymal fluid from mature Holstein bulls. **Journal of Proteomics**, v.73, n.10, p. 2006- 2020, 2010.

MOUSSA, M.; MARTINET, V.; TRIMECHE, A.; TANTURIER, D.; ANTON, M. Low-density lipoproteins extracted from hen egg yolk by an easy method: cryoprotective effect on frozen-thawed bull semen. **Theriogenology**, v. 57, n. 6, p. 1695-1706, 2002.

MUINO-BLANCO, T.; PEREZ-PE, R.; CEBRIAN-PEREZ, J. A. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, sup. 4, 18–31, 2008.

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.

NARESH, S.; ATREJA, S. K. The protein tyrosine phosphorylation during in vitro capacitation and cryopreservation of mammalian spermatozoa. **Cryobiology**, v. 70, n. 3, p. 221-216, 2015.

NAUC, V.; MANJUNATH, P. Radioimmune assays for bull seminal plasma proteins (BSP-A1/-A2, BSP-A3, and BSP-30- Kilodaltons), and their quantification in seminal plasma and sperm. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 4, p. 1058–1066, 2000.

NEF, S.; VERMA-KURVARI, S.; MERENMIES, J.; VASSALLI, J. D.; EFSTRATIADIS, A.; ACCILI, D.; PARADA, L. F. Testis determination requires insulin receptor family function in mice. **Nature**, v. 426, p. 291-295, 2003.

NOGUEIRA, E.; SILVA, C. S.; SILVA, J. C. B.; GARCIA, W. R.; ANANCHE, N. A.; SILVA, K. C.; POTIENS, J. R.; SILVA, E. V. C. Qualidade do sêmen e resultados em programas de IATF em bovinos. Anais da IV Reunião da Associação Brasileira de Andrologia Animal. Campo Grande: UFMS, 2019. v. 1. p. 28-37.

OBEROI, B.; KUMAR, S.; TALWAR, P. Study of human sperm motility post cryopreservation. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 70, n.4, p. 349–353, 2014.

OLIVEIRA, B. M.; ARRUDA, R. P.; THOMÉ, H. E.; MATURANA FILHO, M.; OLIVEIRA, G.; GUIMARÃES, C.; NICHI, M.; SILVA, L. A.; CELEGHINI, E. C. C. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. **Theriogenology**, v. 82, n. 5, 767–772, 2014.

OLIVEIRA, M. K. B.; ZANDONAIDE, J. P. B.; SEVERO, N. C.; GOMES, A.L.; IGARASI, M.S.; QUINTAL, A. P. N.; VASCONCELOS, A.B. Comparison of commercial diluents on motility, functionality and integrity of plasma membrane of bovine spermatozoa. **Revista Brasileira Ciência Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 57-71, 2018.

PADILHA, R. T.; PADILHA-MAGALHAES, D. M.; CAVALCANTE, M. M.; ALMEIDA, A. P. HAAG, K. T.; GASTAL, J. F.; NUNES, A. P.; RODRIGUES, J. R.; FIGUEIREDO, M. A. Effect of insulin-like growth factor-I on some quality traits and fertility of cryopreserved ovine semen **Theriogenology**, v. 78, n. 4, p. 907-913, 2012.

PALMER, D. J.; CHRISTIE, D. J. Identification of molecular aggregates containing Glycoproteins 111, J, K (Carboxypeptidase H), and H (Kex2-related Proteases) in the soluble and membrane fractions of adrenal medullary chromaffin granules. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, v. 28, p. 19806-19812, 1992.

PAN, Y.; BALOCH, C. A. R.; FAN, J.; HE, J.; ZHENG, L. H.; ZHANG, P.; LY, S. Insulin like growth factor I improves yak (*Bos grunniens*) spermatozoa motility and the oocyte cleavage rate by modulating the expression of Bax and Bcl-2. **Theriogenology**, v. 84, n. 5, p. 756-762, 2015.

PERGIALIOTIS, V.; PRODRAMIDOU, A.; FROUNTZAS, M.; KOROU, L. M.; VLACHOS, D.; PERREA, D. Diabetes mellitus and functional sperm characteristics: a meta-analysis of observational studies. **Diabetes and its complications**, v. 30, n. 6, p. 1167-1176, 2016.

PERIS, S. I; MORRIER, A.; DUFOUR, M.; BAILEY, J. L. Cryopreservation of ram semen facilitates sperm DNA damage: relationship between sperm andrological parameters and the sperm chromatin structure assay. **Journal Andrology**, v. 25, n. 2, p. 224-233, 2004.

PHILLIPS, P. H.; LARDY, H. A. A. Yolk-Buffer Pabulum for the preservation of Bull Semen. **Journal of Dairy Science**, v. 23, n. 5, p. 399-404, 1940.

PINTO, S. C. C.; ALMEIDA, D. S.; ALVES, M. B. R.; FLOREZ-RODRIGUEZ, S. A.; ABREU- JÚNIOR, G. S.; BRITTO E ALVES, N.; CELEGHINI, E. C. C.; LASKOKI, L. M.; SOUZA, F. A. Does supplementation of vitamin C, reduced glutathione or their association in semen extender reduce oxidative stress in bovine frozen semen? **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootécnica**, v. 72, n. 1, 9-17, 2020.

PROKS, P.; LIPPIAT, J. D. Membrane ion channels and diabetes. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 4, p. 485–501, 2006.

RAINS, J. L.; JAIN, S. K. Oxidative stress, insulin signaling and diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 50, n. 5, 567-575, 2011.

RASEONA, A. M.; AJAO, O.A.; NETHENGWE, L.D.; MADZHIE, L. R.; NEDAMBALE, T. L.; BARRY, D. M. Viability of bull semen extended with commercial semen extender and two culture media stored at 24 degrees C. **Animal Biotechnology Centre**, v. 47, n. 1 49-57, 2017.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M.; GADELLA, B. M. Evaluation of in Vitro Capacitation of Stallion Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 65 (2), 462-470, 2001.

RÊGO, J. P. A.; CRISP, J.M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N. J.; BURNS, B. M.; BOE-HANSEN, G. B.; MCGOWAN, M. R. Seminal plasma proteome of electro ejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v. 148, p. 1 –17, 2014.

RESENDE, C. O.; BERTARELLI, R. P.; RABELO, S. S.; CHAVES, B. R.; GIL-RODRIGUEZ, J. R.; ZANGERONIMO, M. G. Addition of insulin-like growth factor I (IGF-I) and reduced glutathione (GSH) to cryopreserved boar semen. Addition of insulin-like growth factor I (IGF-I) and reduced glutathione (GSH) to cryopreserved boar semen. **Animal Reproduction Science**, v. 208, p. 106130, 2019.

RICKARD, J. P.; LEAHY, T.; SOLEILHAVOUP, C.; TSIKIS, G.; LABAS, V.; HARICHAUX, G.; LYNCH, G. W.; DRUART, X.; GRAAF, S. P. The identification of proteomic markers of sperm freezing resilience in ram seminal plasma. **Journal of Proteomics**, v. 126, p. 303-311, 2015.

RINDERKNECHT, E.; HUMBEL, R. E. Polypeptides with non-suppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterization, and some biological properties of forms I and II. **Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America**, v. 73, n. 7, p. 2365–2369, 1976.

RODRIGUEZ-VILLAMIL, P.; HOYOS-MARULANDA, V.; MARTINS, J.A.; OLIVEIRA, A.N.; AGUIAR, L.H.; MORENO, F.B.; VELHO, A.L.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; MOREIRA, R.A.; VASCONCELOS, I.M.; BERTOLINI, M.; MOURA, A.A. Purification of binder of sperm protein 1 (BSP1) and its effects on bovine in vitro embryo development after fertilization with ejaculated and epididymal sperm. **Theriogenology**, v. 85, n.3, p. 540-554, 2016.

RONCOLETTA, M.; FRANCESCHINI, P. H.; LIMA, V. F. M. H.; RODRIGUES, L. H.; OLIVEIRA, M. A.; SILVA, C. Perfil em SDS-PAGE das proteínas do plasma seminal e sua relação com a congelabilidade do sêmen de touros doadores da raça gir. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 36, n. 2, 1999a.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H. R.; FRANCHESCHINI, P. H. Proteomics to investigate bull's semen freezability. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50, n. 1, p. 43-49, 2013.

RONCOLETTA, M.; MORANI, E. S. C.; RODRIGUES, L. H.; SILVA, C.; OLIVEIRA, M. A.; Franceschini, P. H.; RAMOS, P. R. R. Comparação do perfil proteico de membrana de espermatozoides do sêmen fresco, diluído e pós-congelamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 23, p. 226-228, 1999b.

RYU, D. Y.; SONG, W. H.; PANG, W. K.; YOON, S. J.; RAHMAN, M. S.; PANG, M.G. Freezability biomarkers in bull epididymal spermatozoa. **Scientific Reports**, v. 9, p. 12797, 2019.

SALAMON, S, MAXWELL, W.M.C. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 77-111, 2000.

SALEHI, M.; AKBARI, H.; HEIDARI, M. H.; MOLOUKI, A.; MURULITHARAN, K.; MOENI, H.; NOVIN, M. G.; AEBED, F.; TAHERI, H.; FADAEI, F.; MOHSENZADEH, M.; JAFARI, M.; PIROUZI, A.; HEIDARI, R. Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 80, n. 9 p. 718-724, 2013.

SALMON, W. D.; JUNIOR- DAUGHADAY, W. A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 49, n. 6, p. 825-36, 1957.

SALVADOR, D. F.; SALVADOR, S.C. Biomarcadores reprodutivos no proteoma do sêmen de touros. **PUBVET**, v. 13, n. 10 1-12, 2019.

SANCHEZ-LUENGO, S.; AUMULLER, G.; ALBRECHT, M.; SEN, P.C.; ROHM, K.; WILHELM, B. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca^{2+} -ATPase. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 2, p. 234-244, 2004.

SANG-MIN, S.; SUHEE, K.; JIN-GI, H.; YONG-JUN, K. IGF-I improves mitochondrial membrane potential during hypothermic storage of canine spermatozoa. **The Journal of veterinary medical science**, v. 76, n. 7, p. 1065-1067, 2014.

SANTIAGO, C. A.; VOGEL, J. L.; AAD, P. Y.; ALLEN, D. T.; STEIN, D. R.; MALAYER, J. R.; SPICER, L. J. Pregnancy-associated plasma protein-A and insulin-like growth factor binding protein mRNAs in granulosa cells of dominant and subordinate follicles of preovulatory cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 28, n. 1, p. 46-63, 2005.

SCHÖNECK, C.; BRAUN, J.; EINSPANIER, R. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal plasma protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. **Theriogenology**, v. 45, n. 3, p. 633-642, 1996.

SELVARAJU, S.; KRISHNAN, B. B.; ARCHANA, S. S.; RIVINDRA, J. P. IGF1 stabilizes sperm membrane proteins to reduce cryoinjury and maintain post-thaw sperm motility in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa. **Cryobiology**, v. 73, n. 1, p. 55-62, 2016.

SELVARAJU, S.; NANDI, S.; SIVA, S.; RAGHAVENDRA, B. S.; RAO, S. B. N.; RAVINDA, J. P. Improvement in buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa functional parameters and fertility in vitro: Effect of insulin-like growth factor-I. **Theriogenology**, v. 73, n. 1, p. 1–10, 2010.

SELVARAJU, S.; REDDY, I. J.; NANDI, S.; RAO S. B.; RAVINDRA, J. P. Influence of IGF-I on buffalo (*Bubalus bubalis*) spermatozoa motility, membrane integrity, lipid peroxidation and fructose uptake in vitro. **Animal Reproduction Science**, v. 113, n. 1-4, p. 60–70, 2009.

SHOKRI, S.; EBRAHIMI, S. M.; ZIAEIPOUR, S.; NEJATBAKHSH, R. Effect of insulin on functional parameters of human cryopreserved sperms. **Criobiology**, v. 87, p. 68-73, 2019.

SILVA, D. M.; ZANGERONIMO, M. G.; MURGAS, L. D. S.; ROCHA, L. G. P.; CHAVES, B. R.; CUNHA, E. C. P. Addition of IGF-I to storage-cooled boar semen and its effect on sperm quality. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 21, n. p. 6325–330, 2011b.

SILVA, P. F. N.; GADELLA, B.M.; COLENBRANDER, B.; ROELEN, B. A. J. Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage. **Theriogenology**, v. 67, n. 3, p. 609–619, 2006.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crio injúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, 370-384, 2011a.

SNOECK, P. P. N. Aspectos da criopreservação de sêmen equino: composição do meio diluidor, curvas de congelamento e fertilidade. **Tese** (Doutorado). Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, p.116.2003.

SORENSEN, E.S.; PETERSEN, T.E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. **Biochemical and Biophysical research communications**, v. 198, n. 4, p. 200-205, 1994.

SOUZA, F.A.; MARTINS, J. A. M.; VALE-FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J. ; FERREIRA, M. B. D.; EMERICK, L. L.; PINTO, P. F. B. ; LEITE, T. G. Leptin and insulin in the seminal plasma of zebu bulls in peripuberty. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 41, n. 4, p. 923-928, 2012.

SUAREZ, S.S. Mammalian sperm interactions with the female reproductive tract. **Cell Tissue Research**, v. 363, n. 1, p. 185-194, 2016.

SYLVESTER, S.; MORALES, C.; OKO, R.; GRISWOLD, M. D. Localization of Sulfated Glycoprotein-2 (Clusterin) on Spermatozoa and in the Reproductive Tract of the Male Rat. **Biology of Reproduction**, v. 45, n. 1, p. 195-207, 1991.

SZTEIN, J. M. ; TAKEO, T.; NAKAGATA, N. History of cryobiology, with special emphasis in evolution of mouse sperm cryopreservation. **Cryobiology**, v. 82, p. 57-63, 2018.

TAKEI, G. L.; MIYASHIRO, D.; MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays an important role in energy transfer from the base to the distal end of the flagellum in mouse sperm. **The Journal of experimental Biology**, v. 217, p. 1876-1886, 2014.

THERIEN, I.; BERGERON, A.; BOUSQUET, D.; MANJUNATH, P. Isolation and characterization of glycosaminoglycans from bovine follicular fluid and their effect on sperm capacitation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 71, n. 1, p. 97-106, 2005.

THEVIS, M.; THOMAS, A.; SCHANZER, W. Insulin. **Handbook of experimental Pharmacology**, v. 195, p. 209-226, 2010.

TONIOLLI, R.; GUIMARÃES, D. B.; BARROS, T. B. Proteínas do sêmen e sua relação com a resistência à congelação em ejaculados de diferentes varrões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 297-311, 2017.

TREULEN, F.; ARIAS, M.E.; AGUILA, L.; URIBE, P.; FELMER, R. Cryopreservation induces mitochondrial permeability transition in a bovine sperm model. **Cryobiology**, v. 83, p. 65-74, 2018.

UGUR, M. R.; ABDELRAHMAN, A. S.; EVANS, H. C.; GILMORE, A. A.; HITIT, M.; ARIFANTINI, R. I.; PURWANTARA, B.; KAYA, A.; MEMILI, E. Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 27, p. 1-15, 2019.

UGUR, M. R.; DINH, T.; HITIT, M.; KAYA, A.; TOPPER, E.; DIDION, B.; MEMILI, E. Amino acids of seminal plasma associated with freezability of Bull Sperm. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v.7, p. 1-14, 2020.

VAN-TILBURG, M. F.; SILVA, J. F. S.; DIAS, A. J. B.; QUIRINO, C.R.; FAGUNDES, B. Influência da Insulina na congelabilidade do sêmen de ovino. **Ciência Animal Brasileira**, v. 9, n. 3, p. 731-739, 2008.

VICKERS, M. H.; CASEY, P. J.; CHAMPION, Z. J.; GRAVANCE, C.G.; BREIER, B.H. IGF-I treatment increases motility and improves morphology of immature

spermatozoa in the GH-deficient dwarf (dw/dw) rat. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 9, n. 4, p. 236-240, 1999.

WANG, P.; WANG, Y. F.; WANG, H.; WANG, C. W.; ZAN, L. S.; HU, J. H.; LI, Q. W.; JIA, Y. H.; MA, G. J. HSP90 expression correlation with the freezing resistance of bull sperm. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 239–45, 2014.

WATERHOUSE, K.E.; GIELDNES, A.; TYERDAL, A.; De ANGELIS, P. M.; FARSTAD, W.; HAAD, M.; KOMMISRUDE, E. Alterations of sperm DNA integrity during cryopreservation procedure and in vitro incubation of bull semen. **Animal Reproduction Science**, v. 117, n. 1-2, 34-42, 2010.

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

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

WEMPE, F.; EINSPIANIER, R.; SCHEIT, K. H. Characterization by cDNA cloning of the mRNA of a new growth factor from bovine seminal plasma: acidic seminal protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 183, n. 1, p. 232-237, 1992.

YAKAR, S.; ADAMO, M. L. Insulin-Like Growth Factor-1 Physiology: Lessons from Mouse Models. **Endocrinology and metabolism Clinic of North American**, v. 41, n. 2, p. 231-247, 2012.

YESTE, M. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. **Theriogenology**, v. 85, n. 1, p. 47–64, 2016.

YOON, S. J.; KWON, W. S.; RAHMAN, M. S.; LEE, J. S.; PANG, M. G. A novel approach to identifying physical markers of cryo-damage in bull spermatozoa. **PLoS One**, 10, e0126232, 2015.

YOSHIDA, M. Conservation of sperm current status and new friends. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

YOUNIS, A. I.; ROOKS, B.; KHAN, S.; GOULD, K. G. 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.

ZANGERONIMO, M. G.; SILVA, D. M.; SOLIS-MURGAS, L.; SOUSA, R. V.; ROCHA, L. L.; PEREIRA, B.; FARIA, B.G.; VERAS, G. C. Identification of insulin-like growth factor-I in boar seminal plasma and its influence on sperm quality. **Archivos de Zootecnia**, v. 62, n. 239, p. 411-418, 2013.

ZORZETTO, M. F. Perfil lipídico do sêmen de touros Nelore (*Bos taurus indicus*) de alta e baixa resistência espermática à criopreservação. **Tese** (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, 2016.

APÊNDICE A – CITOMETRIA DE FLUXO

Figura 7- Avaliação da membrana acrossomal utilizando iodeto de propídio por citometria de fluxo em sêmen criopreservado de touros

Fonte: Pinto (2020).

Legenda: IPDA: membrana plasmática intacta. DPDA: membrana plasmática e acrossomal lesada. IPIA: membrana plasmática e acrossomal intacta. DPIA: membrana acrossomal intacta.

APÊNDICE B- CITOMETRIA DE FLUXO

Figura 8- Avaliação da estabilidade da membrana utilizando Merocianina 540 por citometria de fluxo em sêmen criopreservado de touros

Fonte: Pinto (2020).

Legenda: Imagem A: Células vivas em azul; em preto debris. Imagem B: Células vivas em azul e preto Merocianina.

APÊNDICE C- CITOMETRIA DE FLUXO

Figura 9- Avaliação da peroxidação lipídica utilizando C11 BODIPY® por citometria de fluxo em sêmen criopreservado de touros

Fonte: Pinto (2020).

Legenda: Imagem A: Células vivas em azul; em preto debris. Imagem B: Células vivas em azul e preto peróxidos.

APÊNDICE D- Solução TALP *SPERM* (BAVISTER et al., 1983)

Componentes	Quantidade (g) para preparar 500 mL
NaCl	2,1 g
KCl	0,935 g
NaHCO₃	1,05 g
NaH₂PO₄	0,025 g
CaCl₂ H₂O	0,145 g
MgCl 6H₂O	0,04 g
Hepes	3,25 g

Preparo:

- Diluir CaCl₂ 2H₂O e MgCl 6H₂O em 200 mL de água Milli-Q;
- Os demais sais devem ser diluídos em 200 mL de água Milli-Q;
- Combinar as duas soluções e completar para 500 mL;
- Filtrar;
- Manter resfriado.

2. Solução dos metabólitos glicosados

A. Solução estoque

Componentes	Quantidade (g) para preparar 500 mL
Glicose	2,5 g
Lactato de sódio	9,25 mL
Piruvato de sódio	70 mg
Pen-Strep	12,5 mL

Preparo:

- Dissolver todos os componentes;
- Pipetagem- alíquotas de 5 mL;
- Manter em freezer (-20°C).

B. Solução trabalho

- Pipetar 45 mL da solução de sais de TALP;
- Ajustar pH para 7,4;
- Adicionar 5mL da solução estoque de metabólitos glicosados;
- Filtrar em filtro de 0,45 µm;
- Pipetar- alíquotas de 300 µL;
- Manter em freezer (-20°C).