FLÁVIA DOS SANTOS ALMEIDA

**Efeito da insulina na criopreservação do sêmen bovino sobre a
produção *in vitro* de embriões**

São Paulo
2020

FLÁVIA DOS SANTOS ALMEIDA

**Efeito da insulina na criopreservação do sêmen bovino sobre a
produção *in vitro* de embriões**

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

Departamento:
Reprodução Animal

Área de concentração:
Reprodução Animal

Orientadora:
Profa. Dra. Eneiva Carla Carvalho
Celeghini

São Paulo
2020

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3603
FMVZ

Almeida, Flávia dos Santos
Efeito da insulina na criopreservação do sêmen bovino sobre produção *in vitro* de embriões / Flávia dos Santos Almeida. – 2020.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – 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: Prof. Dra. Eneida Carla Carvalho Celeghini.

1. Touros. 2. FIV. 3. Espermatozoides. 4. Criopreservação. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeito da insulina na criopreservação do sêmen bovino na produção in vitro de embriões.", protocolada sob o CEUA nº 7131081018 (ID 005717), sob a responsabilidade de **Eneiva Carla Carvalho Celeghini e equipe; Flávia dos Santos Almeida** - 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 18/10/2018.

We certify that the proposal "Effect of insulin on cryopreservation of bovine semen on in vitro embryo production.", utilizing 12 Bovines (12 males), protocol number CEUA 7131081018 (ID 005717), under the responsibility of **Eneiva Carla Carvalho Celeghini and team; Flávia dos Santos Almeida** - 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 10/18/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **10/2018** a **03/2019**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **Amostras biológicas estocadas**

Espécie: **Bovinos**

sexo: **Machos**

idade: **0 a 0 horas**

N: **12**

Linhagem: **Nelore**

Peso: **0 a 0 g**

Local do experimento: Este estudo será realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de localizada em Pirassununga-SP em parceria com a Central de Coleta e Processamento de sêmen Alta Genetics (Uberaba-MG). As análises de fragmentação de DNA espermático e a produção in vitro de embriões serão feitas no Laboratório de Fecundação in vitro, Clonagem e Transgenia Animal do Departamento de Reprodução Animal FMVZ/USP, São Paulo-SP. Realizado de janeiro até setembro de 2018.

São Paulo, 14 de janeiro de 2020

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: ALMEIDA, Flávia dos Santos

Título: **Efeito da insulina na criopreservação do sêmen bovino sobre a produção *in vitro* de embriões.**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus por ter me proporcionado esse momento que será eternizado, com força, coragem e por nunca ter deixado eu desistir, aos meus queridos pais Antônio e Noeme que sempre acreditaram em mim, à minha irmã Micheline e ao Willian que são pessoas honestas, educadas e íntegras e que sempre me apoiam, e estão comigo em todos os momentos da minha vida. Dedico ao meu maior presente que Deus me deu durante essa jornada, você filho, por ser a luz, alegria, o amor em forma de sorriso por me inspirar nos momentos difíceis.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela sua infinita bondade e misericórdia por ter me proporcionado essa conquista que não foi fácil, porém ele me concedeu força, coragem e paciência para prosseguir.

A dissertação desse mestrado não poderia chegar à conclusão sem o apoio de várias pessoas, em especial a minha querida orientadora Eneiva Carla Carvalho Celeghini, por toda a paciência, atenção pelos ensinamentos, conselhos, e pela oportunidade de fazer parte da equipe, pelo carinho e amor comigo e como meu filho (Théo).

Aos meus queridos pais pela paciência, esforço para sempre proporcionar o melhor para mim, pelas palavras de incentivo, pelas orações, pelo cuidado que vocês têm comigo e com nosso pequeno príncipe (Théo.)

A Noeme que além de ser minha mãe, é uma pessoa amorosa, carinhosa compreensiva, dedicada e que me apoiou muito nessa fase, e principalmente a ajuda que ela me deu com meu querido filho

Ah, o que seria de mim sem você Micheline, obrigada por não deixar minha peteca cair, pelas palavras de conforto, pelas orações, pelo seu amor, carinho, incentivo, dedicação compreensão e pela nossa irmandade pelo apoio , por dedicar toda atenção e amor e cuidado com nosso pequeno(Théo).

Sou muito grata por esse homem, Willian Magalhães, por me apoiar em todas as minhas decisões, e sempre acreditando no meu potencial, pelas palavras de carinho, e até mesmo pelas palavras rígidas, por seu amor, sua amizade e pelo seu companheirismo, pela oportunidade de ser mãe. Não poderia esquecer de você Elisson, um amigo que está presente em todas as fases da minha vida, sou grata por

você fazer parte de mais uma conquista, pelas orações, incentivos, seu apoio, suas palavras de otimismo, seu sorriso quando eu chegava desesperada falando que o resultado não era o que estava esperando e você como sempre dizia “ calma bicha” tudo vai dá certo e deu, né!

A minha querida tia Eufrozina (ZUZU) que me apoiou e que me ajudou muito nessa fase.

Agradeço ao Departamento de Reprodução Animal da FMVZ da Universidade de São Paulo, pela acolhida e pela oportunidade de realizar este mestrado. A todos os professores que só fizeram aumentar meus conhecimentos em especial a professora Mayra Assumpção por ceder o laboratório para realização da pesquisa. Ao pessoal do Laboratório de Biologia do Espermatozoide (BioSptz), Letícia, Carol, Julia, Marcelo, Felipe, Thais e a Vivian pela ajuda nas aspirações dos oócitos e ao Adriano e Camila Mota, muito obrigada, por vir aos finais de semanais e feriados, e por toda ajuda durante a parte experimental , sem palavras para agradecer essa dupla, adorei trabalhar com vocês.

Vai um muitíssimo obrigada para o grupo de pesquisa LEPPaR, aliás para família que recebeu-me de braços abertos ao Leonardo (Leozito, Bati, Leozinho) que me ajudou extremamente na estatística e pela longa paciência e sempre estava disposto para ajudar, nossa, que ajuda em ! , a Sâmara, Luiza que me ajudou quando mais precisei, Bruna, e você Laura Nataly (Natika, colombiana) que cativou meu coração e se tornou uma grande amiga e madrinha do nosso pequeno e danado Théo, que não deixou eu desistir, quando eu falei que seria difícil com filho, por me escutar nos longos áudios do whatsapp, pelos risos, pelas palavras de incentivos que foram muitas, pela ajuda ,por tudo, muito obrigada minha querida amiga.

Agradeço a todos que fizeram parte da minha vida na USP.

Obrigada à agência de fomento, CNPq pela bolsa concedida nº do processo 134226/2017-8.

“Educação não transforma o mundo, educação muda as pessoas e pessoas mudam o mundo.”

Paulo Freire

RESUMO

ALMEIDA, F.S.: **Efeito da insulina na criopreservação do sêmen bovino sobre a produção *in vitro* de embriões**. [Effect of insulin on bovine semen cryopreservation on in vitro embryo production]. 2020. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A insulina é um hormônio anabólico capaz de atuar na proteção das células espermáticas para minimizar os insultos da criopreservação, também atua na produção de embriões *in vitro* (PIVE) trazendo benefícios no desenvolvimento embrionário devido ao seu efeito antiapoptótico e mitogênico. Desta forma, o presente trabalho visa avaliar os efeitos da adição de insulina ao meio de criopreservação de sêmen sobre o potencial da PIVE de embriões. Para isso, foram utilizados dois ejaculados de seis touros (n=12), sendo que cada ejaculado foi distribuído em dois tratamentos para a criopreservação: Grupo controle (CO): sêmen diluído em meio Triladyl® (n=12) e Grupo Insulina (IN): sêmen diluído em meio Triladyl suplementado com insulina (150 µUI/mL, n=12). Duas palhetas de sêmen de cada partida de cada tratamento foram descongeladas, homogeneizadas e submetidas à seleção em gradiente de Percoll®. Os espermatozoides obtidos após Percoll® foram avaliados quanto à motilidade, vigor, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e fragmentação de DNA e, após foram utilizados para a fecundação *in vitro* (FIV) dos ovócitos. Para a FIV foram feitas quatro repetições, sendo aspirados folículos de ovários provenientes de abatedouro comercial e selecionados os complexos cumulus-oócito que apresentavam camadas de células do *cumulus* compactas e oócito com citoplasma homogêneo. Os oócitos foram submetidos ao processo de maturação *in vitro* (MIV) (24h/38,5°C/5%CO₂). Para a FIV, os oócitos maturados foram distribuídos em dois grupos, sendo que um grupo recebeu o sêmen CO (n=1587) oócitos e o outro o sêmen IN (n= 1580). oócitos e incubados (18h/38,5°C/5%CO₂). Após a FIV os presumíveis zigotos foram transferidos para o cultivo *in vitro* seguindo a ordem dos tratamentos e incubados por 8 dias (38,5°C/5%CO₂/5%O₂/90%N₂). A resposta da FIV foi determinada pela taxa de clivagem no terceiro dia do cultivo. No dia 8, avaliou-se o número de blastocisto e a taxa de desenvolvimento em relação aos clivados. Os dados foram submetidos à

análise de variância pelo procedimento misto (PROC MIXED) do programa SAS versão 9.3. Em todas as análises estatísticas, o nível de significância considerado foi de $P \leq 0,05$. A taxa de clivagem (D3) não foi afetada pela adição de insulina ao diluidor de criopreservação do sêmen ($64,21 \pm 2,04$ x $63,62 \pm 1,69\%$), mas foi notada que a insulina causou redução nas taxas de blastocisto (CO: $24,06 \pm 2,69\%$ x IN: $20,04 \pm 2,54\%$) e de desenvolvimento embrionário (CO: $35,81 \pm 3,23\%$ x IN: $30,21 \pm 3,37\%$). Por outro lado, foram encontrados efeitos de touro para as taxas de clivagem (variando de $54,19 \pm 2,34$ a $71,91 \pm 2,39\%$), de blastocisto (variando de $6,76 \pm 0,97$ a $36,18 \pm 2,22\%$) e de desenvolvimento embrionário (variando de $12,32 \pm 1,53$ a $50,12 \pm 2,04\%$), mas estas alterações não foram relacionadas com variações na qualidade espermática. Em conclusão, a insulina adicionada ao meio de criopreservação dos espermatozoides não apresentou efeito benéfico nas condições experimentais sobre as taxas de produção de embriões *in vitro*.

Palavras chaves: Touros, FIV, Espermatozoide, Criopreservação

ABSTRACT

ALMEIDA, F.S. **Effect of insulin on bovine semen cryopreservation on in vitro embryo production** [Efeito da insulina na criopreservação do sêmen bovino sobre a produção in vitro de embriões]. 2020. 64 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Insulin is an anabolic hormone capable of acting in the protection of sperm cells to minimize cryopreservation insults, also acts in the production of in vitro embryos (PIV) bringing benefits in embryonic development due to its effect antiapoptotic and mitogenic. Thus, the present study aims to evaluate the effects of insulin addition to the means of cryopreservation of semen on the potential of PIV of embryos. For this, two ejaculates of six bulls (n=12) were used, each ejaculate was distributed in two treatments for cryopreservation: Control group (CO): semen diluted in Triladyl medium (n = 12) and Insulin Group (IN): semen diluted in Triladyl medium supplemented with insulin (150 μ IU/mL, n = 12). Two semen reeds from each match of each treatment were thawed, homogenized and submitted to percoll gradient selection®. Sperm obtained after Percoll® were evaluated for motility, vigor, (acridine orange), plasma membrane and acrosomal integrity, mitochondrial potential and DNA fragmentation, and after they were used for in vitro fertilization (IVF) of embryos. For PIV, four replications were performed, and ovaries follicles from commercial slaughterhouse were aspirated and the cumulative-oocyte complexes that presented layers of compact and oocyte cumulus cells with homogeneous cytoplasm were selected. The oocytes were submitted to the maturation process in vitro (IVM) (22h/38.5°C/5%CO₂) and IVF performed shortly after maturation. Matured oocytes were distributed into two groups, one group received semen CO (n=1587) and the other semen IN (n= 1580). After fertilization the oocytes were incubated (18h/38.5°C/5%CO₂) and the presumed zygotes were transferred to in vitro cultivation following the order of treatments and incubated for 8 days (38.5°C/5%CO₂/5%O₂/90%N₂). The IVF response was determined by the cleavage rate on the third day of cultivation. On day 8, the number of blastocyst and the development rate were evaluated in relation to presumed zygotes. The data were submitted to variance analysis by the mixed procedure (PROC MIXED) of the SAS version 9.3 program. In all statistical analyses, the significance level considered was $P \leq 0.05$. Cleavage rate was not affected by the addition of insulin to the cryopreservation dilution of semen (64.21 ± 2.04 x $63.62 \pm 1.69\%$), but insulin was

noted to have caused a reduction in blastocyst rates (CO: $24.06 \pm 2.69\%$ x IN: $20.04 \pm 2.54\%$) and embryonic development (CO: $35.81 \pm 3.23\%$ x IN: $30.21 \pm 3.37\%$). On the other hand, bull effects were found for cleavage rates (ranging from 54.19 ± 2.34 to $71.91 \pm 2.39\%$), blastocyst (ranging from 6.76 ± 0.97 to $36.18 \pm 2.22\%$) and embryonic development (ranging from 12.32 ± 1.53 to $50.12 \pm 2.04\%$), but these changes were not related to variations in sperm quality. In conclusion, insulin added to sperm cryopreservation extender has no beneficial effect on embryo production rates in vitro.

Keywords: Bulls, IVF, Sperm, Cryopreservation

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Média $\pm$ erro padrão das taxas de clivagem, de blastocisto e de desenvolvimento embrionário utilizando-se sêmen controle ou adicionado de 150 μ UI/mL de insulina	42
Tabela 2: Média $\pm$ erro padrão da taxa de clivagem de embriões bovinos fertilizados com espermatozoides criopreservados com e sem a adição de insulina nos diferentes touros.....	42
Tabela 3: Média $\pm$ erro padrão da taxa de blastocisto fertilizados com espermatozoides criopreservados com e sem a adição de insulina nos diferentes touros.	43
Tabela 4: Média $\pm$ E.P.M. da taxa de desenvolvimento embrionário após fertilização com espermatozoides criopreservados com e sem a adição de insulina nos diferentes touros.....	43
Tabela 5: Média $\pm$ erro padrão da motilidade espermática Pré e Pós-Percoll das amostras de sêmen criopreservados com ou sem a adição de insulina de touros da raça Nelore, utilizadas para a fertilização in vitro.	44
Tabela 6: Média $\pm$ erro padrão do vigor espermático (escore 1 - 5) Pré e Pós-Percoll das amostras de sêmen criopreservado com ou sem a adição de insulina de touros da raça Nelore, utilizadas para a fertilização in vitro.	45
Tabela 7: Média $\pm$ erro padrão da porcentagem de membrana plasmática íntegra (MPI) de sêmen criopreservado de bovinos adicionado ou não com insulina ao diluidor para criopreservação.....	45
Tabela 8: Média $\pm$ erro padrão da membrana acrossomal íntegra (MAI) das amostras de sêmen criopreservado de bovinos adicionadas ou não de insulina.....	46
Tabela 9: Média $\pm$ E.P.M. da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossomal íntegra (PIAI) tratado com 150 μ UI/mL de insulina e controle.	46
Tabela 10: Média $\pm$ E.P.M. da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossoma lesado (PLAL) de sêmen criopreservado adicionado ou não de insulina Pós-Percoll.....	47
Tabela 11: Média $\pm$ erro padrão de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial das amostras de sêmen criopreservados com ou sem a adição de insulina.....	47
Tabela 12: Média $\pm$ erro padrão de espermatozoides com intermediário potencial de membrana mitocondrial das amostras de sêmen criopreservados com ou sem a adição de insulina.....	48

Tabela 13: Média $\pm$ erro padrão de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial das amostras de sêmen criopreservados com ou sem a adição de insulina.	48
Tabela 14: Média $\pm$ erro padrão da fragmentação de DNA nas células espermática criopreservadas com diluidor acrescido ou não de 150 μ UI/mL de insulina.	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosinatrifosfato
CCS	Células do cumulus oophorus
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EROS	Espécie reativa de oxigênio
FITC-PSA	Isotiocianato de fluoresceína conjugada com aglutinina de <i>Pisum sativum</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
<i>g</i>	Força gravitacional
GC	Grupo controle
GI	Grupo insulina
GLUT	Transportador de glicose
IGF-I	Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
μL	microlitro
mL:	mililitro
n:	número
OPU	ovum pick up
PI	Iodeto de propídeo
PIV	Produção <i>in vitro</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SCSA	Sperm chromatin structure assay
UI	Unidades internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	22
2.2 INSULINA.....	23
2.3 INSULINA X PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	25
2.4 INSULINA E A QUALIDADE ESPERMÁTICA	26
2.4.1 Criopreservação espermática.....	27
2.4.2 Integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial mitocondrial	29
2.4.3 Fragmentação de DNA espermático.....	30
3 ARTIGO: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE INSULINA AO SÊMEN CRIOPRESERVADO SOBRE A PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	33
3.1 INTRODUÇÃO	34
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.2.1 Local e período experimental	36
3.2.2 Processamento do sêmen e divisão dos grupos experimentais.....	36
3.2.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE)	37
3.2.4 Análise do sêmen pós-Percoll®	39
3.2.4.1 Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial.....	39
3.2.4.2 Avaliação da fragmentação do DNA.....	40
3.2.5 Análise estatística	41
3.3 RESULTADOS	41
3.4 DISCUSSÃO	49
3.5 CONCLUSÃO.....	52
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	54
REFERÊNCIAS.....	55

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Segundo o IBGE (2018), estima-se que o rebanho bovino no Brasil apresentou 214,9 milhões de cabeças em 2017, sendo o segundo maior do mundo, ficando atrás apenas da Índia, além disso, na exportação de carne ficou em primeiro lugar com 346,155 toneladas de carne *in natura*. Estes índices são reflexos do desenvolvimento e avanço tecnológico da pecuária nas últimas décadas, nos quais se destacam as biotécnicas da reprodução animal, que visa a expansão da eficiência reprodutiva do rebanho (AMARAL; LEAL, 2017). Dentre elas, a produção *in vitro* (PIVE) de embriões vem alcançando um grande sucesso na escala comercial o que insere o país em âmbito de destaque no cenário mundial (MELLO et al., 2016). No ano de 2011, o Brasil teve um aumento 15,7% da produção de embriões comparado ao ano anterior, totalizando 350.762 embriões, e dessa produção 90,7% foi *in vitro*, essa expansão ocorreu a partir de 2005, quando a produção de embriões *in vivo* foi substituída de forma progressiva para a PIV (VIANA, 2012). Ainda em 2014, o Brasil foi o maior produtor de embriões do mundo atingindo 70% da produção total, sendo 366.517 unidades ao ano (IETS, 2014). Porém, com a crise econômica que ocorreu no país entre 2014 e 2016 (IBGE, 2017) houve diminuição da influência nacional neste setor. Sendo assim, em 2017, o Estados Unidos da America (EUA) registrou um aumento de embriões PIV maior que do Brasil (421.123 vs. 345.528), sendo o país a liderar o ranking mundial levando em consideração os números totais *in vivo* e *in vitro*. Mesmo assim, o Brasil corresponde 34,8% da produção global em PIVE (VIANA, 2018).

Apesar da PIV ser uma técnica bem estabelecida ainda apresenta alguns aspectos que restringem os resultados, como: qualidade dos oócitos obtidos, os meios para o cultivo utilizados; a qualidade do sêmen; a interação entre o touro e a vaca selecionados (NICACIO, 2016) e o processo de preparação do sêmen para realizar a fecundação *in vitro* (FIV). Contudo, para melhorar os resultados da PIVE estudos têm sido realizados para avaliar os efeitos de algumas substâncias no meio de maturação e de cultivo. A insulina é uma dessas substâncias, caracteriza-se como um hormônio anabólico essencial para manutenção da homeostase de glicose e do crescimento e diferenciação celular (CARVALHEIRA et al., 2002), Na reprodução ela tem papel fundamental como mediadora da esteroidogênese, crescimento e

maturação folicular (KEZELE et al., 2002), além de promover a regulação de transporte de glicose, exerce atividade antiapoptótica e mitogênica em embrião (AUGUSTIN et al., 2003).

O uso da insulina na PIV mostra efeitos benéficos como relatado no estudo de Ocana-Quero et al. (1998), no qual foi notado que a adição desta ao meio de maturação(TCM-199 contendo 10% de soro fetal) com concentração de insulina 10mg/ml aumentou a porcentagem de maturação nuclear, fertilização e clivagem, além disso, no estudo de Augustin et al. (2003) sua adição durante o cultivo resultou na redução de apoptose e melhorou a qualidade final do blastocisto.

Além da insulina promover efeitos benéficos na PIVE, ela também causa efeito sobre os espermatozoides como mostrou o estudo de Tilburg (2008), sendo que a concentração de 0,3 e 3,0 UI/mL de insulina ao diluidor de criopreservação de sêmen de ovino promoveu aumento na motilidade, cinética e integridade de acrossomo no sêmen pós-criopreservação. Em humanos, as concentrações de 10, 100, 500 e 1000 ng/mL de insulina ao diluidor de criopreservação do sêmen resultou em aumento da motilidade espermática e diminuição das espécies reativas de oxigênio em todas as concentrações; além disso, a concentração de 100 ng/mL apresentou diminuição significativa na fragmentação de DNA (SHOKRI et.al., 2019).

Dessa forma, o presente trabalho objetivou a avaliação dos efeitos da adição de insulina ao diluidor de criopreservação do sêmen sobre a PIVE, considerando as taxas de clivagem, blastocisto e de desenvolvimento embrionário, bem como sua relação com as características espermáticas (motilidade, vigor, membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e fragmentação de DNA) após seleção em gradiente de Percoll.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

Serão abordados na revisão de literatura uma atualização sobre a PIVE de bovinos, bem como as implicações da insulina sobre a PIVE e a qualidade espermática, considerando os meios para a criopreservação e ações na fragmentação do DNA, integridade das membranas plasmática e acrossomal.

2.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A PIV é uma biotécnica de enorme importância para exploração do potencial genético de fêmeas bovinas. Essa técnica surgiu no Brasil a partir da década de 90 (MELLO et al., 2016), e desde então seu uso é cada vez mais explorado. O principal objetivo desta biotécnica é obter oócitos e em seguida embriões viáveis a partir de fêmeas saudáveis de alto potencial genético, além daquelas que não estão mais aptas de gerar crias pelas técnicas convencionais. Além disso, uma grande vantagem é a diminuição do intervalo entre as gerações, acelerando o ganho genético, possibilitando assim, a utilização de animais jovens, gestantes ou lactantes (TANEJA et al., 2000). Uma outra característica positiva desta técnica, segundo Bousquet et al. (1999), é que não há necessidade de administrar hormônios para superestimular as fêmeas, assim reduz os riscos de problemas reprodutivos decorrentes da administração hormonal.

Para a concretização da PIVE, é necessário que ocorra a interação entre o espermatozoide e o oócito fora do trato reprodutivo da fêmea. Assim, a PIVE compreende as seguintes etapas: a colheita dos oócitos, a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos, a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões (GONÇALVES et al., 2008). Os oócitos para realização dessa técnica podem ser oriundos de ovários de animais vivos, que procede por meio de laparoscopia via flanco, em pequenos ruminantes ou pela técnica da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom *Ovum Pick Up* (OPU) em bovinos (VARAGO et al., 2008) ou obtidos de animais mortos que os ovários são proveniente de abatedouros.

Após o procedimento da aspiração e seleção dos oócitos, estes devem submetidos à maturação, que compreende as seguintes transformações: a nuclear; e

maturação citoplasmática (SZOLLOSI, 1993; MERMILLOD et al., 2008), que são responsáveis por apresentar inúmeras transformações bioquímicas e estruturais no núcleo e no citoplasma, sendo primordial para o processo de fecundação e para o desenvolvimento embrionário (GUEMRA et al., 2013), essa fase dura aproximadamente 24 horas. Após a etapa de maturação, os oócitos precisam ser fecundados para que sejam capazes de se desenvolver até o estágio final de blastocisto. Nessa etapa da FIV, o espermatozoide precisa estar apto para fecundar o oócito maturado, por esse motivo é necessário que os meios e os protocolos utilizados promovam um ambiente adequado, permitindo o metabolismo dos oócitos, além de preservar a função espermática para que ocorra a fecundação (ASSUMPÇÃO et al., 2002).

Com esse propósito é fundamental ter agentes capacitadores no meio da FIV, por exemplo, a heparina que é um tipo de glicosaminoglicano capaz de induzir a capacitação espermática (PARRISH et al., 1988). Após as 18 horas da fertilização, os possíveis zigotos deverão ser cultivados em temperatura e meios adequados para propiciar as diversas divisões (clivagem) e alterações morfológicas formando mórulas até evoluírem para blastocisto (YANAGIMACHI, 1994), estágio adequado para realização da transferência ou criopreservação.

2.2 INSULINA

A insulina foi descoberta em 1921, por Banting e Best depois que Van Mering e Menkowsky iniciaram suas pesquisas com animais pancreatectomizados (RAW, 1948). A insulina é um hormônio proteico, anabólico produzido no pâncreas e liberado pelas células beta da ilhota pancreática, essencial para regulação de diversos processos biológicos. Para que a insulina inicie suas funções é necessário que haja a síntese, e isso sucede a partir das células beta do pâncreas, onde a pré-insulina é clivada em proinsulina no retículo endoplasmático rugoso. O processo da conversão ocorre no complexo de golgi, onde a proinsulina sofre clivagem e forma a insulina ativa (GOULÃO et al., 2007). Esse hormônio contém 51 aminoácidos, sendo 21 da cadeia alfa e 30 da cadeia beta, essas cadeias são ligadas por um dissulfeto (HASSAN et al., 2014).

A insulina é armazenada em grânulos junto com peptídeos C, amilina e outros derivados da célula beta (NISHI et al., 1990). A liberação da insulina na corrente sanguínea ocorre por exocitose (GOULÃO et al., 2007).

A insulina tem papel fundamental no controle da homeostase glicêmica por meio do estímulo à captação de glicose nos tecidos sensíveis à insulina como: músculo esquelético e tecido adiposo, além de ser responsável pela inibição da liberação de glicose pelo fígado (KAHN, 2000); em adição, atua no metabolismo de lipídeos, síntese proteica, expressão gênica, crescimento, divisão e sobrevivência celular (JENSEN, 2009). O excesso de glicose na corrente sanguínea estimula a liberação da insulina pelas células beta (JEFFREY et al., 2000), ou seja, a insulina é responsável pela entrada e atuação da glicose na célula, para isso ocorrer é necessário que a insulina se ligue ao seu receptor na membrana e a glicose seja transportada. Esse transporte é feito por diferentes proteínas como as GLUT (transporte de glicose), que são específicas para cada tecido e realizam o transporte passivo facilitado (MUECKLER; THORENS, 2013) e pelas SGLTs, que são os transportadores ativos de glicose acoplados ao sódio (WRIGHT et al., 2011; WRIGHT, 2013).

As proteínas SGLTs são compostas por 6 tipos, sendo SGLT 1 e 2 responsáveis para transportar glicose no intestino, coração e rim, já a SGLT 3 atua como sensor de glicose nos seguintes órgãos: intestino, fígado, baço, rim e músculo; enquanto, as SGLT 4 e 6 transportam inositol e multivitamínicos e a SGLT 5 é a proteína fundamental para transportar iodeto de tireoide (LITWACK, 2018). São escassos os relatos sobre atuação dessa proteína nos testículos e nos espermatozoides.

As GLUTs são compostas por 14 proteínas (LITWACK, 2018), além de facilitar o transporte de açúcares tem distribuição em diferentes tecidos inclusive na membrana plasmática dos espermatozoides (BUCCI, 2011).

A GLUT 2 é a única que atua como transportador de difusão facilitada expresso pelas células beta e também é encontrada em outros tecidos como, hepatócitos, rins e intestino, estes transportadores são os primeiros sensores da glicose a ser detectados (PAIVA, 2014). Quando a glicose é transportada para o interior da célula, a mesma é fosforilada pela enzima glicocinase e transformada em glicose-6 fosfato e logo após a fosforilação vai para via glicolítica e ciclo de krebs gerando adenosina trifosfato (ATP). O ATP tem função na ativação da bomba de sódio e potássio e no fechamento do canal de potássio. O fechamento desse canal na membrana celular

causa despolarização e abertura dos canais de cálcio voltagem-dependentes, promovendo o influxo de cálcio e a liberação de insulina na corrente sanguínea (FU et al., 2013).

2.3 INSULINA X PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES

A insulina é um hormônio que controla a secreção de gonadotrofina e é considerado um importante mediador na regulação da esteroidogênese, crescimento folicular e maturação (YASEEN et al., 2001; KEZELE et al., 2002).

Foram identificados receptores de insulina expressos nas células do *cumulus* (CCs) e do oócito (ACEVEDO et al., 2007), podendo atuar em qualquer fase do desenvolvimento embrionário, desde zigoto ao blastocisto (SCHULTZ et al., 1992), e auxilia na melhora da pré-implantação do embrião juntamente com o hormônio Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-1) (SPANOS et al., 2000).

A concentração de insulina usada na PIVE é bem mais elevada comparada com a concentração fisiológica encontrada no soro sanguíneo ou fluido folicular (LASKOWSKI et al., 2016). Durante o processo de MIV dos oócitos, os efeitos da insulina não estão bem esclarecidos. No entanto, Ocanã-Quero et al. (1998) relataram que a suplementação de insulina bovina com 10 mg/mL em meio contendo soro aumentou a porcentagem de maturação nuclear, fertilização e clivagem. Já a exposição prolongada de insulina (5 mg/mL) durante a maturação de oócito de camundongo promoveu a inativação da enzima Glicogen Sintase kinase (GSK3), que resultou em anormalidade de formação de fuso meiótico e aumentou a incidência de segregação de cromossomo homólogo anormal durante a meiose (WANG et al., 2003). Entretanto, o maior nível de concentração de insulina (100 ng/mL) no processo de maturação na espécie suína denotou a capacidade de aumentar a taxa de formação de blastocisto comparada ao meio sem insulina (LEE et al., 2005).

A adição de insulina ou IGF-1 em níveis fisiológicos durante o cultivo *in vitro* causa redução da apoptose (FABIAN et al., 2004), promove aumento da proliferação celular em blastocisto de bovinos, coelhos, humanos e camundongos (HERRLER et al., 1998; AUGUSTIN et al., 2003). Por outro lado, o uso elevado de insulina na PIV pode aumentar o estresse oxidativo por meio de sua função metabólica nas células, podendo ter consequências negativas para o embrião em desenvolvimento (LASKOWSKI, 2017).

2.4 INSULINA E A QUALIDADE ESPERMÁTICA

O plasma seminal de mamíferos é composto de secreções oriundas de fluídos das glândulas sexuais acessórias, epidídimo e sua formação afeta a função espermática desde a maturação no epidídimo até a fecundação do oócito no trato reprodutivo das fêmeas (MOURA et al., 2011). Durante esse percurso os espermatozoides adquirem várias proteínas além de ter contato com hormônios, principalmente os produzidos pelos testículos (YANAGIMACHI, 1994). Entre os hormônios encontrados no plasma seminal, destacam-se o IGF, a insulina e a leptina, por exercerem papel essencial na motilidade espermática, favorecendo a fecundação (AHIMA et al., 2000; TENA-SEMPERE; BARREIRO, 2002).

A insulina é um hormônio importante para regulação do crescimento, metabolismo e diferenciação celular. Ela exerce papel fundamental na regulação central da função gonadal (AQUILA et al., 2005). Segundo Nakayama et al. (1999), a insulina favorece a diferenciação celular nos testículos, transformando a espermatogônia em espermátócito primário pela ligação com os receptores de IGF-I. A membrana plasmática e o acrossoma do espermatozoide expressam receptores para insulina, sendo que ela pode atuar no metabolismo espermático (SILVESTRONI et al., 1992), ou seja, esses receptores são responsáveis pela penetração da glicose na célula espermática e com isso, são capazes de realizar a função metabólica.

Além da insulina ser encontrada na membrana plasmática e acrossomal, o estudo de Aquila et al. (2005) identificou, por meio de análise imuno histoquímico, insulina na peça intermediária e ao longo de todo flagelo do espermatozoide não capacitado em nível subacrossomal. Dessa maneira, os espermatozoides humanos são capazes de realizar a regulação do metabolismo de glicose já que é capaz de expressar e secretar insulina (regulação autócrina) e acredita-se em possível envolvimento na indução da capacitação, já que nessa função há um gasto excessivo de energia devido ao aumento no metabolismo, sendo a insulina crucial para gerenciar o status energético (AQUILA et al., 2005).

A insulina também é responsável pela manutenção da atividade flagelar, devido ao aumento da sua concentração que promove maior captação de glicose pelas células espermáticas (TILBURG et al., 2008). No estudo de Abdelmonein et al. (1998), verificou-se que adição de insulina, transferrina e selênio no meio de criopreservação

de sêmen de chimpanzé, foi capaz de proteger os espermatozoides durante o processo de criopreservação e aumentou a motilidade pós congelação, sendo que o efeito benéfico dessas substâncias estão relacionadas as suas funções fisiológicas como: a estimulação anabólica da insulina, que é capaz de aumentar a motilidade e os efeitos do selênio e transferrina que são capazes de eliminar os radicais livres, protegendo a membrana plasmática contra peroxidação lipídica. De acordo com Tilburg et al. (2006), em ovinos a adição de insulina no meio também teve efeitos promissores sobre a integridade do acrossoma, motilidade progressiva, retilinearidade e linearidade.

2.4.1 Criopreservação espermática

A criopreservação é um processo que permite manter o metabolismo celular em repouso tornando possível bloquear os gastos energéticos e a produção de catabólicos, com a finalidade de preservar as características celulares por tempo indeterminado (LEITE et al., 2011).

O processo de criopreservação do sêmen desempenha papel primordial para o melhoramento genético (inseminação artificial, transferência e PIVE) e preservação de espécies ameaçadas de extinção (WATSON, 2000) além de possibilitar a diminuição do risco e custos com aquisição de reprodutores e rápida difusão do material genético (VALENTE et al., 2010).

No entanto, durante o processo de criopreservação podem ocorrer danos irreversíveis às membranas espermáticas como mudanças na fluidez, ruptura, edema, alterações na ação enzimática e no influxo de cálcio, comprometendo assim suas funções (WATSON, 1995). Durante a criopreservação, a membrana espermática também sofre peroxidação lipídica, levando à formação de espécies reativas ao oxigênio (ROS) que prejudicam a integridade da membrana plasmática e DNA, além de reduzir a motilidade dos espermatozoides sobreviventes, levando à diminuição da fertilidade (HU et al., 2010).

Os diluidores auxiliam no processo de criopreservação na tentativa de diminuir os danos causados por esse processo (JASKO, 1994), pois auxiliam na preservação da integridade e habilidade de fecundação (MANJUNATH et al., 2002). Os danos causados durante o processo de criopreservação acontecem quando as células são expostas a diferentes situações de estresse, como mudanças de temperatura e

estresse osmótico devido à elevada concentração de soluto do diluidor de congelação, que levam à formação de cristais de gelo no meio extracelular, comprometendo a viabilidade espermática (WATSON, 2000). A primeira mudança acontece quando as células espermáticas são expostas à temperatura de refrigeração (5°C) (SQUIRES et al., 1999), já que essa temperatura modifica o estado da membrana plasmática de líquido para o estado de gel (MEDEIROS et al., 2002). Tal mudança gera consequências irreversíveis sobre a viabilidade dos espermatozoides devido à diminuição da motilidade, taxa de glicose e da respiração celular. Além disso, ocorre aumento dos danos no DNA e liberação de material intracelular (WATSON, 2000; HOLT, 2000).

No momento que a célula espermática atinge a temperatura negativa (entre 0 e -40°C), inicia-se a fase de congelação, neste período podem ocorrer os principais danos às células (WOLFE; BYANT, 2001). Esses danos ocorrem principalmente quando o processo de congelação acontece de forma rápida, já que, nessas condições há a formação de cristais de gelo que danificam a membrana celular (GRAHAM; MOCÉ, 2005). Já quando ocorre de forma lenta, leva à desidratação excessiva dos espermatozoides, devido à grande concentração de soluto que é responsável por causar danos aos espermatozoides (AMANN; PICKETT, 1987).

Com o propósito de proteger os espermatozoides durante o processo de congelação e descongelação, na tentativa de manter o potencial fertilizante, é comum a utilização de crioprotetores, que são classificados em intracelulares (glicerol, dimetilsulfóxido, dimetilformamida, etilenoglicol e propilenoglicol) e extracelulares (açúcares, proteínas e polímeros sintéticos) (NIEMANN, 1991). Os crioprotetores são substâncias necessárias para impedir a formação de gelo intracelular (MEDEIROS et al., 2002), minimizando os efeitos deletérios causados pelo processo de criopreservação.

Mesmo com as melhores condições de criopreservação, há perda de aproximadamente 50% da população de espermatozoides móveis e, aqueles que sobrevivem, podem sofrer alterações que comprometam sua atividade funcional (MEDEIROS et al., 2002). Essas, podem levar à perda da integridade das membranas plasmática e acrossomais, bem como queda do potencial mitocondrial (CELEGHINI et al., 2008) e eventualmente redução na fertilidade (OLIVEIRA et al., 2014).

2.4.2 Integridade das membranas plasmática e acrossomal e o potencial mitocondrial

A parte mais vulnerável na estrutura dos espermatozoides durante o processo de criopreservação é a membrana plasmática (BORGES et al., 2011), que deve permanecer intacta e funcional para permitir a capacidade, proteção, funcionamento celular e para o processo de fertilização (ARRUDA; CELEGHINI, 2003).

Para avaliar a integridade da membrana plasmática, podem ser utilizadas sondas fluorescentes. O iodeto de propídio (PI) é um corante fluorescente que se liga especialmente ao DNA, não atravessa a membrana plasmática íntegra, e nas células que estão com as membranas danificadas coram os núcleos em vermelho (CELEGHINI, 2005). A sonda Hoescht 33342 consegue atravessar a membrana plasmática íntegra (CELEGHINI, 2005) e atua como um marcador de membrana plasmática íntegra quando associado a outra sonda como por exemplo o PI (MAXWELL, 1997).

O acrossomo é importante para o potencial de fertilidade do macho, já que dispõe de enzimas que participam efetivamente do processo de fertilização (FERNANDES; PIMENTEL, 1997). Essas enzimas são primordiais para os espermatozoides penetrarem na zona de pelúcida e para que ocorra a fusão com a membrana plasmática do oócito (DIAZ-PERES et al., 1988). Portanto, para os espermatozoides se ligarem à zona pelúcida e fecundar o oócito, é necessário que ele seja capacitado e passe por reação acrossomal (PEREIRA et al., 2000; BREITBART et al., 2005).

A integridade do acrossoma pode ser avaliada por sondas fluorescentes, tais como a aglutinina de *Pisum Sativum* (PSA), este, tem afinidade a glicoproteínas presentes na membrana acrossomal e quando conjugada ao isotiocianato de fluorescência (FITC) marca o acrossomo espermático em verde amarelado identificando o acrossomo danificado (GRAHAM et al., 1990, FARLIN et al., 1992).

A mitocôndria é necessária para o processo fisiológico da célula espermática e importante na geração de energia, oriunda da produção de ATP proporcionando movimento celular (CAMARA; GUERRA, 2008). Essa energia fica localizada na peça intermediária responsável pela motilidade espermática, portanto, se ocorrer qualquer modificação na função mitocondrial pode provocar alteração na motilidade espermática (GRAVANCE et al., 2000). Por essa razão, é essencial avaliar sua funcionalidade.

Durante o processo de fosforilação oxidativa, são produzidas espécies reativas ao oxigênio (EROS) que exercem função fundamental no processo fisiológico. Se a mitocôndria sofrer uma disfunção pode levar ao desequilíbrio entre a produção de EROS e os mecanismos antioxidantes, propiciando o estresse oxidativo, que por sua vez é prejudicial aos espermatozoides. Dessa forma, a mitocôndria está envolvida tanto no processo fisiológico quanto patológico da célula espermática (ANGRIMANI et al., 2015). A atividade mitocondrial é avaliada como alto e baixo potencial devido a sua capacidade de transformar energia para a célula. Para isso, pode ser utilizada a sonda JC-1, que determinam o potencial da membrana mitocondrial (SILVA; GADELLA, 2006), sendo assim, os espermatozoides que apresentam a peça intermediária em vermelho têm alto potencial de membrana mitocondrial e os marcados em verde baixo potencial (CELEGHINI, 2005).

2.4.3 Fragmentação de DNA espermático

A formação do DNA espermático inicia durante a espermatogênese, nos testículos, nessa fase o DNA está agregado às histonas como em outra célula somática qualquer (D'OOCHIO et al., 2007); sendo que sua formação é finalizada durante a maturação espermática, na passagem pelo epidídimo, quando o DNA espermático passa por uma grande compactação, até 10 vezes mais quando comparado com DNA de uma célula somática (MILLER et al., 2010), além de obter a forma e o tamanho do núcleo diferentes (DADOUNE, 2003).

Alguns fatores são determinantes para que ocorra a fragmentação do DNA, entre eles têm-se: presença de radicais livres de oxigênio (SUN et al., 1997; GOSALVEZ et al., 2006), erro durante a compactação da cromatina no processo de substituição de histonas por protaminas (SAILER et al., 1999; GOSALVEZ et al., 2006) e a ocorrência de apoptose celular (GOSALVEZ et al., 2006).

Os danos causados ao DNA podem levar à morte celular, induzir mutação que pode refletir na próxima geração ou levar a infertilidade do macho (CARREIRA, 2012). Embora o oócito tenha uma capacidade de corrigir danos no DNA espermático antes que ocorra a fecundação, essa correção é limitada (DERIJCK et al., 2008). Em vista dessas informações ficam bem claras que, a integridade do DNA torna-se um fator essencial como indicador da qualidade do espermatozoide (HUGHES et al., 1999).

Para detectar danos ao DNA espermático são utilizados diversos testes como: ensaio cometa, teste de depressão da cromatina modificada (SCD), tunel, sperm chromatin structure (SCSA), laranja de acridina, azul de toluidina, azul de analina, técnica de cromomicina A3 (CMA3). Segundo Fonseca (2014), o método SCSA é o mais utilizado para detectar danos ao DNA e é capaz de analisar grande quantidade celular quando comparado a outros métodos.

A técnica SCSA foi desenvolvida por Evenson et al. (1980) para avaliar a susceptibilidade do DNA espermático, íntegro e fragmentado, por meio da utilização da citometria de fluxo com o corante laranja de acridina, que possui propriedades metacromáticas. Quando o DNA espermático estiver íntegro a célula apresenta coloração verde, e quando está fragmentado apresenta coloração vermelho ou alaranjado.

3 ARTIGO: EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO DE INSULINA AO SÊMEN CRIOPRESERVADO SOBRE A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica importante para aumentar a produtividade do rebanho bovino. Para melhores resultados na PIVE, a adição de insulina, hormônio responsável pela regulação da glicose, crescimento e diferenciação celular, é capaz de melhorar a taxa de clivagem e do desenvolvimento do estágio final do blastocisto. Neste mesmo sentido, foi hipotetizado que a adição de insulina ao diluidor de criopreservação pode contribuir na melhorar da taxa de fertilização *in vitro* (FIV). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar se a adição de insulina ao diluidor de criopreservação de sêmen é capaz de melhorar os a eficiência da PIVE em bovinos. Foram feitas quatro repetições de PIVE, sendo aspirados folículos provenientes de ovários de abatedouro, e selecionados os complexos cumulus-oócito que apresentavam camadas de células do *cumullus* compactas e oócito com citoplasma homogêneo (graus I e II). Os oócitos foram submetidos ao processo de maturação *in vitro* (22h/38,5^{od}C/5%CO₂). Para a fecundação *in vitro* (FIV) utilizaram-se dois ejaculados de seis touros da raça Nelore. Cada ejaculado foi dividido em duas frações iguais, sendo uma fração diluída com Triladyl® (controle) e a outra diluída com Triladyl® adicionado de 150 µUI/mL de insulina. Ambas as amostras foram criopreservadas em sistema automático. Duas palhetas de sêmen de cada ejaculado de cada tratamento foram descongeladas em banho-maria (37°C/30 segundos), submetidas ao gradiente de Percoll e avaliadas quanto à motilidade, vigor, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial mitocondrial e fragmentação de DNA. Além disso, na FIV, os oócitos maturados foram distribuídos randomicamente, em dois grupos experimentais: Controle (CO) - oócitos maturados que receberam o sêmen diluído apenas com o Triladyl® (n=1.587) e Insulina (IN) - oócitos maturados que receberam o sêmen diluído com Triladyl® adicionado de insulina (n=1.580). Os oócitos foram incubados com o sêmen (18h/38,5°C/5%CO₂). Após a FIV os possíveis zigotos foram transferidos para o cultivo *in vitro* obedecendo aos tratamentos e incubados por 8 dias (38,5°C/5%CO₂/5%O₂/90%N₂). A resposta da FIV foi determinada pela taxa de clivagem, analisando o número de embriões divididos em dois ou mais blastômeros (D3). No dia 8, avaliou-se o número de blastocisto e a taxa de desenvolvimento em

relação aos possíveis zigotos. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo procedimento misto (PROC MIXED) do programa SAS, utilizando-se as repetições como blocos. Foi considerada significância de 5%. Não foram notados efeitos da suplementação de insulina sobre as taxas de clivagem (CO: $64,22 \pm 2,04\%$ x IN: $63,62 \pm 1,69\%$), taxas de blastocistos (CO: $24,06 \pm 2,69\%$ x IN: $20,04 \pm 2,54\%$) e de desenvolvimento embrionário (CO: $35,81 \pm 3,23\%$ x IN: $30,21 \pm 3,37\%$). Dessa forma, conclui-se que nesse estudo a adição de $150 \mu\text{UI/mL}$ de insulina ao sêmen de bovinos não apresentou nenhum efeito citotóxico aos espermatozoides quando comparado com o sêmen que não recebeu tratamento e não afetou as taxas de clivagem, porém apresentou efeito prejudicial na taxa de blastocistos e de desenvolvimento embrionário em bovinos. Contudo, cabe realizar mais estudos para verificar se adição de insulina ao sêmen poderia apresentar efeitos benéficos para a PIVE.

Palavras chaves: Touros, FIV, Espermatozoide, Criopreservação

3.1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma técnica que possui diversas etapas, desde seleção dos oócitos até a entrega do produto na receptora, sendo seus resultados influenciados por diversos fatores (qualidade dos oócitos obtidos, os meios utilizados, qualidade do sêmen, entre outros) que podem levar à diminuição da produtividade (NICACIO, 2016). Por essa razão, estudos de substâncias como: insulina, transferrina, selênio e ácido L-ascórbico no meio da maturação e do desenvolvimento embrionário de bovino e outras, poderiam contribuir na melhora da qualidade dos embriões (PEREIRA, 2013).

A insulina é um hormônio peptídeo produzido pelas células das ilhotas de Langerhans (SHAHID; SINGH, 2019), que desempenha um papel fundamental no equilíbrio da captação de glicose e aminoácidos, devido ao efeito mitogênico e anti-apoptótico. Ela é utilizada na PIV para auxiliar no aumento das taxas de clivagem e blastocisto em bovinos (AUGUSTIN et al., 2003; LEE et al., 2005).

Acevedo et al. (2007) identificaram a presença de receptores de insulina na célula do cumulus (CCs) e nos oócitos, e de acordo com Schultz et al. (1992), tanto a insulina, o fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), quanto o fator de

crescimento semelhante a insulina II (IGF-II) expressam receptores no zigoto, e nos embriões em desenvolvimento e blastocisto. Além disso, segundo Silvestroni et al. (1992), há receptores de insulina na membrana plasmática e acrossomal do espermatozoide. Segundo Aquila (2005), os espermatozoides são aptos a secretarem insulina que está localizada no nível subacrossomal e por toda cauda, essa secreção é proveniente do estímulo da glicose que está presente no plasma seminal, fluido do trato reprodutivo da fêmea *in vivo* (KOCH, 1980) ou pelo meio de cultura *in vitro* (TRAVIS et al., 2001). Tilburg et al. (2006) notaram que quanto maior a concentração de insulina no meio de criopreservação de sêmen de ovino, maior foi a quantidade de espermatozoides com a membrana do acrossomo íntegra após a descongelação.

A insulina no gameta masculino está envolvida com a capacitação espermática. Conforme Aquila (2005), a incubação de 10×10^6 espermatozoides em meio não capacitante foi de 0,1-0,73 $\mu\text{UI/mL}$, sendo significativamente menor do que aquele produzido por espermatozoides incubados em meios de capacitação (4-12 $\mu\text{UI/mL}$)

A síntese de ácido ribonucleico (RNA), ácido desoxirribonucleico (DNA), lipídeos, proteínas aumenta as funções intracelulares da membrana plasmática, que pode ser responsável por melhorar a sobrevivência espermática após o processo de congelamento e descongelamento (ABDELMONEIN et al., 1998).

Como se sabe, durante o desenvolvimento embrionário inicial *in vivo* os embriões recebem a insulina por meio de fluidos uterinos e da tuba uterina maternos (HERNER, et al., 1989). Por outro lado, durante o cultivo *in vitro* esses embriões são privados desse hormônio materno, desencadeando atraso no seu desenvolvimento morfológico e na proliferação celular durante a embriogênese na pré-implantação (GARDNER; KAYE, 1991).

Baseados nessas informações e na escassez de estudos do efeito da adição de insulina ao meio de criopreservação do sêmen em bovino sobre a taxa de fertilização *in vitro* (FIV), este estudo foi delineado. A hipótese deste estudo foi que a adição de insulina ao meio de criopreservação do sêmen melhora a preservação das características dos espermatozoides durante a criopreservação e com isso afeta positivamente a taxa de produção *in vitro* de embriões bovinos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da suplementação de insulina ao diluidor de criopreservação espermática de touros sobre a taxa de clivagem, blastocisto e de

desenvolvimento embrionário e suas relações com a qualidade espermática pós-seleção por gradiente de Percoll®.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local e período experimental

O experimento foi realizado no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Patologia da Reprodução (LEPPaR) do Centro de Biotecnologia em Reprodução Animal (CBRA) do Departamento de Reprodução Animal (VRA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), localizado no Campus “Fernando Costa”, Pirassununga-SP. As análises do sêmen pós-percoll e a produção *in vitro* de embriões foram realizadas no Laboratório de Biologia do Espermatozoide (BioSptz) do Departamento de Reprodução Animal FMVZ/USP, Campus da Capital, São Paulo-SP. O experimento foi realizado no período 23 de outubro de 2017 até 12 de dezembro de 2018.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP), protocolo número CEUA 7131081018.

3.2.2 Processamento do sêmen e divisão dos grupos experimentais

Para este experimento foram utilizados seis touros da raça Nelore mantidos em piquetes individuais na Central de Coleta e Processamento de Sêmen Alta Genetics do Brasil, Uberaba-MG. As colheitas foram realizadas por vagina artificial a cada dois dias no mês de outubro de 2018, e utilizaram-se dois ejaculados de cada touro.

Após a colheita foram avaliados vigor, motilidade e concentração de cada ejaculado e em seguida foi dividido em duas frações para diluição em meio de criopreservação nos seguintes grupos experimentais: Grupo controle (CO): sêmen diluído em meio Triladyl® (n=12) e Grupo Insulina (IN): sêmen suplementado com 150 µUI/mL de Insulina em meio Triladyl® (n=12). O processo de criopreservação das amostras foi realizado em palhetas de 0,25 mL na concentração de 25×10^6

espermatozoides/mL mantidas por 3 horas em refrigeração e depois congeladas em sistema automatizado da minitube (Turbofreezer L for freezing bull sêmen in straws).

3.2.3 Produção *in vitro* de embriões (PIVE)

A capacidade fecundante dos espermatozoides criopreservados e suplementados com insulina foi avaliada pela produção *in vitro* de embriões. Foram realizadas 4 repetições.

Os oócitos para a realização da produção *in vitro* de embriões foram oriundos de ovários de um abatedouro comercial, localizado no município de Piracicaba/SP. Após a colheita dos ovários, estes foram transportados em um recipiente térmico a 37°C, com solução salina 0,9% e com antibiótico.

No laboratório os ovários foram lavados com a mesma solução pré-aquecida, e em seguida, foram aspirados folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm, com seringas de 5 mL e agulha 21 G. O líquido folicular aspirado foi depositado em tubo cônico de 15 mL e mantido em banho-maria por 10 minutos para a sedimentação.

Após a sedimentação do pellet o líquido folicular foi recuperado com auxílio de uma pipeta *Pauster* e depositado em placas de petri contendo o meio de rastreamento (TCM-199 Hepes, gentamicina 50 µg/mL, piruvato 22 µg/mL e soro fetal 1%) aquecido. Posteriormente, os oócitos foram classificados em lupa estereoscópica, com aumento de 2-3 x, em Grau I, II, III e IV, de acordo com Leibfried e First (1979).

Os oócitos selecionados para MIV foram classificados quanto a integridade e compactação das camadas das células do *cumulus* e homogeneidade do citoplasma, sendo grau I e grau II foram lavados três vezes em meio pré MIV (TCM199 Hepes suplementando com 10% de SFB, 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina) e três vezes em outro meio MIV (TCM199 Bicabornato suplementado com 10 % de SFB, 22 µg/mL de piruvato, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de FSH, 50 µg/mL de gonodotrofina coriônica humana e 1 µg/mL de 17β-estradiol). Logo após as lavagens, os oócitos foram transferidos para placa contendo o meio de MIV e separados em gotas de 90 µL, contendo a mesma quantidade de oócitos por gota (20 oócitos/gota) recobertos por óleo mineral, e maturados em incubadora com 5% de CO₂, com umidade saturada e temperatura de 38,5 °C durante 22 a 24 horas (CASTRO et al., 2016).

Após as 24 horas foi verificada a maturação oocitária em lupa estereoscópica com aumento de 2-3 x, observando a expansão das células do *cumulus*, o enegrecimento das mesmas e a característica do ooplasma (WURTH; KRIUP, 1992). Após o período de maturação, os oócitos foram lavados três vezes no meio pré-FIV (TCM Hepes suplementado com 0,003% de BSA-V, 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina) e logo após foram para a quarta gota, composta pelo meio FIV (TL Stock: 50 µg/mL gentamicina, 22 µg/mL piruvato e BSA livre de ácidos graxos com agentes capacitores) em seguida os oócitos maturados foram transferidos para placa com gota de meio FIV (composto pelo meio FIV mais heparina, penicelamina, hipotaurina, epinefrina) sob óleo mineral.

Para realização da FIV foram descongeladas duas palhetas de sêmen de cada touro, sendo uma de cada ejaculado do mesmo tratamento. As palhetas foram descongeladas a 37°C por 30 segundos, o conteúdo das duas palhetas, ambas com a mesma concentração (25×10^6 espermatozoides/mL), foram colocadas em um microtubo pré-aquecido, homogeneizado e em seguida avaliado quanto a motilidade e o vigor. Para estas análises, uma amostra do sêmen (5 µL) foi colocada entre lâmina e lamínula pré-aquecidas na temperatura de 37° C, sendo avaliada por microscopia de contraste de fase em aumento de 100x (DIC modelo 80i, Nikon, Tokyo, Japão). A motilidade foi estimada em percentual de células móveis (SEAGER; FLETCHER, 1972) e o vigor em escores de 1 a 5, sendo 1 referente ao movimento mais lento e aumentando progressivamente até o escore 5, que se refere a velocidade máxima em linha reta. Após as análises da motilidade e do vigor, o sêmen foi depositado delicadamente em um gradiente descontínuo de Percoll® (45% e 90%) e centrifugado a 6600 g/5 minutos em temperatura de 37°C. O gradiente de Percoll foi preparado em um microtubo de 1,5 mL contendo uma camada de 200 µL de Percoll 90% e uma de 200 µL de Percoll 45%.

Depois da centrifugação, o sedimento contendo as células móveis foi recuperado e transferido para um microtubo contendo 1 mL de meio FIV sem agentes capacitores e novamente centrifugado por 3 minutos a 1100 g para lavagem. Após essa centrifugação, uma amostra do *pellet* foi retirada para avaliação pós-percoll. O sedimento ressuspenso foi ajustado para concentração de 25×10^6 espermatozoides móveis/mL (100.000 espermatozoides móveis/gota). Após o ajuste da concentração espermática, cada gota foi inseminada com 4 µL de sêmen e em seguida as placas de FIV, foram mantidas em incubadora a 38,5 °C com alta umidade

e 5% de CO₂ em ar, por 20 horas. Após as 20 horas os presumíveis zigotos foram lavados e o excesso de células do cumulus foi retirado mecanicamente, por pipetagem sucessiva em meio pré-FIV. Logo após, foram submetidos a uma segunda lavagem no meio SOF (aminoácidos essenciais e não essenciais, soro fetal bovino 5% e 50 mg/mL gentamicina) e transferidos para placa e cultivados no meio SOF por 8 dias em incubadora a 38,5°C, 5% de CO₂, 5% de O₂ e 90% de N₂, sob alta umidade.

No 3º dia do cultivo foi realizado o *feeding*, no qual foi realizada a remoção das células do cumulus excedentes e a determinação da taxa de clivagem, que foi sucedida quando os presumíveis zigotos sofreram sucessivas divisões celulares e o momento em que o meio da placa CIV foi renovado, ou seja, retirou-se 45 µL do meio SOF e acrescentou-se a mesma quantidade do mesmo meio, retornando para incubadora. Essa renovação de meio ocorreu no dia 5 do cultivo novamente. No dia 08 do cultivo foi avaliada a taxa de blastocistos e a taxa do desenvolvimento embrionário (taxa blastocisto/clivado).

3.2.4 Análise do sêmen pós-Percoll®

Após centrifugação do sêmen em gradiente de Percoll®, uma amostra do *pellet* foi retirada para avaliação, sendo avaliados motilidade e vigor, como descrito anteriormente, bem como as membranas e o DNA espermáticos.

3.2.4.1 Avaliação das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial

A avaliação da integridade das membranas plasmática e acrossomal e do potencial de membrana mitocondrial, foi realizada utilizando as sondas fluorescentes iodeto de propídio (PI), aglutinina da *Pisum sativum* conjugada ao isotiociano de fluoresceína (FITC-PSA) e iodeto de 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl-benzimidazolylcarbocyanine (JC-1). Para realizar essas análises, foram utilizados 7,5 µL de sêmen, aproximadamente 187.500 células em 30 µL de meio FIV.

A avaliação das membranas plasmáticas, acrossomais e mitocondrial foi realizada simultaneamente na mesma amostra, sendo acrescentadas no mesmo tubo 10 µM de PI, 5 µg de FITC-PSA e 1 µM de JC-1 (concentração final). Para realização da leitura das sondas foi usado o citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini System

(Guava Technologies, Hayward, CA, E.U.A), que possui um laser azul operando a 488nm e emite radiação a laser de 20 mW e os dados referente à fluorescência amarela (PM1-photodetector-583nm), vermelha (PM2-photodetector-680 nm) e verde (PM-photodetector-525 nm) foram avaliados pelo software FlowJo. Estas análises foram realizadas com base no protocolo descrito por Celeghini et al. (2007) e nas modificações realizadas por Siqueira (2016).

3.2.4.2 Avaliação da fragmentação do DNA

A avaliação da fragmentação do DNA foi realizada pela técnica Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) de acordo com protocolo descrito por Evenson et al. (2002) e com pequenas alterações feitas por Simões (2010). Esse procedimento foi realizado com 375.000 células, no qual 15 µL de sêmen foi diluído para um volume total de 100 µL com tampão de TNE (Tris-HCl 0,01M, NaCl 0,15 M, EDTA 1mM em água destilada, com pH7,4) e centrifugado e retirado o sobrenadante, deixando o *pellet*, e em seguida adicionado 50 µL de TNE sob o *pellet*, homogeneizado e incubados imediatamente com 100 µL de solução de detergente ácido (HCl 0,08 M, NaCl 0,15 M, Triton x-100 0,1%) com pH 1,2. Após 30 segundos, foi adicionado 300 µL de solução de laranja de acridina (LA) contendo 6 µg LA/mL de tampão (ácido cítrico 0,1 M, Na₂HPO₄, 0,2 M, EDTA 0,001M, NaCl 0,15 M) com pH 6,0.

As amostras foram analisadas após 3-5 minutos de incubação a 37°C utilizando o citômetro de fluxo Guava EasyCyte Mini System, descrito anteriormente.

As células foram classificadas quanto à mudança metacromática verde e vermelho, sendo que quando o DNA está íntegro apresenta a cor verde, e quando o DNA está danificado apresenta vermelho-alaranjado. Para validação de técnica e determinação dos *gates* de seleção e identificação da população positiva e negativa, um controle positivo (células incubadas em detergente ácido modificado 1,2 M HCl, pH = 0,1) e negativo foram analisados individualmente e misturados nas seguintes proporções 1:3, 1:1 e 3:1. Os *gates* de seleção e o corte entre a população negativa e positiva estabelecidos na validação foram aplicados para todas a análise de todas as amostras deste estudo (SIQUEIRA et al., 2016).

3.2.5 Análise estatística

Os dados obtidos dos procedimentos experimentais foram analisados utilizando o programa estatístico Statistical Analysis System 9.4 (SAS Institute Inc., 2004), com prévia verificação da normalidade dos resíduos pelo teste de Shapiro-Wilk (PROC UNIVARIATE). As variáveis que não atenderam às premissas estatísticas foram submetidas à transformação e/ou feita a retirada dos outliers. As variáveis que mesmo após as transformações e/ou retirada de outliers não atenderam as premissas foram analisadas pela estatística não paramétrica de Kruskal-Wallis.

Os dados originais ou transformados, quando este procedimento foi necessário, foram submetidos à Análise de Variância, pelo procedimento MIXED (PROC MIXED do SAS), utilizando-se o teste de Tukey para comparação entre as médias, sendo previamente testada a melhor matriz (menor AICC) para cada variável. Primeiramente foi feita a observação de interação entre TRATAMENTO x ANIMAL. Quando não houve interação foi observado o efeito isolado de tratamento e de animal. Foi considerada significância de 5% ($P < 0,05$) para determinar a ocorrência das diferenças estatísticas.

3.3 RESULTADOS

O atual trabalho estudou o efeito da adição de insulina ao diluidor de criopreservação do sêmen sobre a capacidade de fecundação do espermatozoide na FIV. O efeito da insulina na PIVE sobre as taxas de clivagem, de blastocisto e de desenvolvimento embrionário podem ser observados na Tabela 1. Não foram notados efeitos da adição de insulina ao sêmen sobre a taxa de clivagem ($p=0,7745$); no entanto, notou-se que a adição de insulina reduziu a taxa de blastocisto ($p=0,049$) e a taxa de desenvolvimento embrionário ($p=0,0292$).

Tabela 1: Média $\pm$ erro padrão das taxas de clivagem, de blastocisto e de desenvolvimento embrionário utilizando-se sêmen controle ou adicionado de 150 μ UI/mL de insulina

Taxas da PIV	Controle	Insulina	Valor de P
Taxa de Clivagem (%)	64,21 $\pm$ 2,04	63,62 $\pm$ 1,69	0,7745
Taxa de Blastocistos (%)	24,06 $\pm$ 2,69	20,04 $\pm$ 2,54	0,049
Taxa de desenvolvimento embrionário (%)	35,81 $\pm$ 3,23	30,21 $\pm$ 3,37	0,0292

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

PIV: Produção in vitro de embriões.

Em vista dos resultados, os efeitos de animal (touro) foram avaliados e estão apresentados nas Tabelas de 2 a 4.

Foi observado efeito da taxa de clivagem entre os animais ($P < 0,001$), como apresentado na Tabela 2, sendo que os touros B, C e F apresentaram as maiores taxas de clivagem do que os touros A, D e E; no entanto, não houve efeito dos tratamentos dentro de cada touros.

Tabela 2: Média $\pm$ erro padrão da taxa de clivagem de embriões bovinos fertilizados com espermatozoides criopreservados com e sem a adição de insulina nos diferentes touros.

Touro	Controle (%)	Insulina (%)	Média $\pm$ E.P.M (%)
A	60,46 $\pm$ 5,11	60,49 $\pm$ 2,95	60,47 $\pm$ 2,73 ^B
B	74,12 $\pm$ 3,20	69,69 $\pm$ 3,21	71,91 $\pm$ 2,39 ^A
C	66,97 $\pm$ 1,09	69,12 $\pm$ 3,21	68,05 $\pm$ 1,62 ^A
D	53,98 $\pm$ 2,97	54,40 $\pm$ 4,09	54,19 $\pm$ 2,34 ^B
E	58,02 $\pm$ 4,10	59,46 $\pm$ 1,92	58,73 $\pm$ 2,11 ^B
F	71,75 $\pm$ 4,76	68,59 $\pm$ 3,36	70,17 $\pm$ 2,76 ^A
Valor de P			< 0,001

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

^{A,B}: letras diferentes na coluna significam diferença estatística pelo teste de Tukey.

A taxa de blastocisto também foi diferente ($p < 0,0001$) entre os touros como se pode observar na Tabela 3, sendo as melhores taxas para os touros B e F, seguidos

do touro C. Notou-se uma variação entre a maior taxa de blastocisto ($36,18 \pm 2,22\%$) e a menor ($6,76 \pm 0,97\%$).

Tabela 3: Média $\pm$ erro padrão da taxa de blastocisto fertilizados com espermatozoides criopreservados com e sem a adição de insulina nos diferentes touros.

Touro	Controle (%)	Insulina (%)	Média $\pm$ E.P.M
A	$18,73 \pm 2,30$	$13,59 \pm 2,58$	$16,16 \pm 1,87^C$
B	$39,20 \pm 2,67$	$33,17 \pm 3,16$	$36,18 \pm 2,22^A$
C	$24,83 \pm 2,15$	$26,35 \pm 0,89$	$25,59 \pm 1,11^B$
D	$6,59 \pm 1,73$	$6,93 \pm 1,74$	$6,76 \pm 0,97^D$
E	$17,53 \pm 2,99$	$8,59 \pm 2,15$	$13,06 \pm 2,40^{C,D}$
F	$37,45 \pm 6,61$	$31,64 \pm 6,58$	$34,54 \pm 4,45^A$
Valor de P			$< 0,0001$

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

A,B,C,D: letras diferentes na coluna significam diferença estatística pelo teste de Tukey.

De forma semelhante, a taxa de desenvolvimento embrionário, avaliada no 8º dia de cultivo de embriões, foi diferente entre os animais ($P < 0,0001$), sendo os melhores resultados observados para os touros B e F, seguidos do touro C. O pior resultado foi encontrado para o touro D. A taxa de desenvolvimento embrionário variou entre $50,12 \pm 2,04$ e $12,32 \pm 1,53\%$, conforme pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4: Média $\pm$ E.P.M. da taxa de desenvolvimento embrionário após fertilização com espermatozoides criopreservados com e sem a adição de insulina nos diferentes touros.

Touro	Controle (%)	Insulina (%)	Média $\pm$ E.P.M (%)
A	$31,68 \pm 4,90$	$23,13 \pm 5,25$	$27,41 \pm 3,69^C$
B	$52,77 \pm 1,97$	$47,47 \pm 3,29$	$50,12 \pm 2,04^A$
C	$37,10 \pm 3,20$	$38,19 \pm 0,60$	$37,65 \pm 1,52^B$
D	$12,00 \pm 2,68$	$12,64 \pm 1,93$	$12,32 \pm 1,53^D$
E	$29,89 \pm 3,99$	$14,39 \pm 3,31$	$22,14 \pm 3,78^C$
F	$51,44 \pm 6,01$	$45,45 \pm 8,24$	$48,45 \pm 4,85^A$
Valor de P			$< 0,0001$

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

A,B,C,D: letras diferentes na coluna significam diferença estatística pelo teste de Tukey.

Os efeitos de touros podem ser explicados pela qualidade do sêmen criopreservado, assim os resultados da qualidade espermática dos touros estão apresentados nas Tabelas 5 a 14.

A motilidade espermática total Pré-Percoll e Pós-Percoll diferiu entre os touros quando se considerou a média, mas esta diferença não foi notada, quando os touros foram comparados entre os tratamentos (controle e insulina), conforme mostrado na Tabela 5, porém não apresentou efeito de tratamento e nem interação entre animal e tratamento ($P>0,05$).

Tabela 5: Média $\pm$ erro padrão da motilidade espermática Pré e Pós-Percoll das amostras de sêmen criopreservados com ou sem a adição de insulina de touros da raça Nelore, utilizadas para a fertilização in vitro.

Touro	Pré-Percoll (%)			Pós-Percoll (%)		
	Controle	Insulina	Média $\pm$ E.P.M.	Controle	Insulina	Média $\pm$ E.P.M.
A	67,50 $\pm$ 2,50	67,50 $\pm$ 2,50	67,50 $\pm$ 1,63 ^B	70,00 $\pm$ 2,04	71,25 $\pm$ 4,26	70,62 $\pm$ 2,20 ^C
B	66,25 $\pm$ 4,73	62,50 $\pm$ 6,29	64,37 $\pm$ 3,71 ^C	73,75 $\pm$ 2,39	72,50 $\pm$ 2,50	73,12 $\pm$ 1,61 ^B
C	70,00 $\pm$ 4,08	78,75 $\pm$ 1,25	74,37 $\pm$ 2,57 ^A	77,50 $\pm$ 3,22	80,00 $\pm$ 0	78,75 $\pm$ 1,56 ^A
D	60,00 $\pm$ 4,08	70,00 $\pm$ 0	65,00 $\pm$ 2,67 ^B	70,00 $\pm$ 2,04	72,00 $\pm$ 1,44	71,25 $\pm$ 1,25 ^B
E	76,25 $\pm$ 1,25	77,50 $\pm$ 3,23	76,87 $\pm$ 1,61 ^A	78,75 $\pm$ 3,14	76,25 $\pm$ 2,39	77,50 $\pm$ 1,88 ^A
F	68,75 $\pm$ 3,15	73,75 $\pm$ 5,54	71,25 $\pm$ 3,09 ^{AB}	75,00 $\pm$ 2,04	77,50 $\pm$ 3,22	76,25 $\pm$ 1,82 ^{A,B}
Valor de P	>0,05	>0,05	0,0068	>0,05	>0,05	0,0122
Média $\pm$ E.P.M.	71,66 $\pm$ 1,82	68,12 $\pm$ 1,61		74,16 $\pm$ 1,15	75,00 $\pm$ 1,16	

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

^{A,B,C}, letras diferentes na coluna significam diferença estatística pelo teste de Tukey.

Como pode ser observado na Tabela 6, o vigor espermático não apresentou efeito de tratamento, touro e nem efeito de interação entre tratamento e animal ($P>0,05$).

Tabela 6: Média $\pm$ erro padrão do vigor espermático (escore 1 - 5) Pré e Pós-Percoll das amostras de sêmen criopreservado com ou sem a adição de insulina de touros da raça Nelore, utilizadas para a fertilização in vitro.

Touro	Pré-Percoll			Pós-Percoll		
	Controle	Insulina	Média $\pm$ E.P.M.	Controle	Insulina	Média $\pm$ E.P.M.
A	3,00 $\pm$ 0	3,00 $\pm$ 0	3,00 $\pm$ 0	3,50 $\pm$ 0,28	3,75 $\pm$ 0,25	3,62 $\pm$ 0,18
B	3,00 $\pm$ 0	2,97 $\pm$ 4,73	2,98 $\pm$ 0,24	3,57 $\pm$ 0,42	3,25 $\pm$ 0,25	3,41 $\pm$ 0,23
C	3,37 $\pm$ 0,23	3,25 $\pm$ 0,25	3,31 $\pm$ 0,16	3,50 $\pm$ 0,50	3,50 $\pm$ 0,50	3,50 $\pm$ 0,32
D	3,25 $\pm$ 0,47	2,75 $\pm$ 0,25	3,00 $\pm$ 0,26	3,60 $\pm$ 0,24	3,25 $\pm$ 0,25	3,42 $\pm$ 0,17
E	3,22 $\pm$ 0,13	3,35 $\pm$ 0,23	3,28 $\pm$ 0,12	3,50 $\pm$ 0,50	4,12 $\pm$ 0,12	3,81 $\pm$ 0,26
F	3,35 $\pm$ 0,23	2,82 $\pm$ 0,17	3,08 $\pm$ 0,16	3,80 $\pm$ 0,41	3,25 $\pm$ 0,25	3,48 $\pm$ 0,23
Média$\pm$ E.P.M	3,20 $\pm$ 0,11	3,02 $\pm$ 0,09	-	3,56 $\pm$ 0,14	3,52 $\pm$ 0,12	-

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

Não houve diferença estatística, $P>0,05$.

Quanto a integridade das membranas plasmática e acrossomal, também não foram notados efeitos de tratamento, mas efeito de touro, como pode ser observado nas Tabelas de 7 a 10.

Tabela 7: Média $\pm$ erro padrão da porcentagem de membrana plasmática íntegra (MPI) de sêmen criopreservado de bovinos adicionado ou não com insulina ao diluidor para criopreservação.

Touro	Controle (%)	Insulina (%)	Média $\pm$ E.P.M (%)
A	69,81 $\pm$ 3,55	65,30 $\pm$ 5,14	67,56 $\pm$ 3,01 ^A
B	57,57 $\pm$ 5,53	55,81 $\pm$ 2,78	56,69 $\pm$ 2,88 ^{A,c}
C	65,93 $\pm$ 4,3,2	64,34 $\pm$ 4,31	65,14 $\pm$ 2,84 ^{A,D}
D	54,47 $\pm$ 4,98	55,50 $\pm$ 6,42	54,98 $\pm$ 3,76 ^{B,C,D}
E	57,51 $\pm$ 3,11	50,11 $\pm$ 5,32	53,81 $\pm$ 3,18 ^{B,C,}
F	63,61 $\pm$ 1,91	60,28 $\pm$ 4,39	61,95 $\pm$ 2,27 ^{A,C}
Valor de P	-	-	< 0,0004
Média $\pm$ E.P. M	61,48 $\pm$ 1,85	58,56 $\pm$ 2,07	-

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

^{A,B,C,D} letras diferentes na coluna significam diferença estatística pelo teste de Tukey.

Tabela 8: Média $\pm$ erro padrão da membrana acrossomal íntegra (MAI) das amostras de sêmen criopreservado de bovinos adicionadas ou não de insulina.

Touro	Controle (%)	Insulina (%)	Média $\pm$ E.P.M (%)
A	78,70 $\pm$ 3,21	75,75 $\pm$ 5,21	67,56 $\pm$ 3,01 ^A
B	63,22 $\pm$ 5,05	65,12 $\pm$ 3,0,7	56,69 $\pm$ 2,88 ^{A,c}
C	80,92 $\pm$ 1,18	80,62 $\pm$ 2,23	65,14 $\pm$ 2,84 ^{A,D}
D	61,42 $\pm$ 3,42	63,10 $\pm$ 2,34	54,98 $\pm$ 3,76 ^{B,C,D}
E	68,57 $\pm$ 3,25	60,95 $\pm$ 3,93	53,81 $\pm$ 3,18 ^{B,C,}
F	69,70 $\pm$ 3,38	67,88 $\pm$ 3,54	61,95 $\pm$ 2,27 ^{A,C}
Valor de P			<0,0004
Média $\pm$ E.P.M.	70,42 $\pm$ 1,95	68,90 $\pm$ 1,94	

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

A,B,C letras diferentes na coluna significam diferença estatística pelo teste de Tukey.

Quando se avaliou a porcentagem de células espermáticas apresentando simultaneamente integridade das membranas plasmática e acrossomal (PIAI), também foram encontradas diferenças entre animais ($p=0001$), variando entre 44,82 $\pm$ 2,77 e 61,96 $\pm$ 3,45 conforme mostrado na Tabela 9.

Tabela 9: Média $\pm$ E.P.M. da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática íntegra e acrossomal íntegra (PIAI) tratado com 150 μ UI/mL de insulina e controle.

Touro	Controle (%)	Insulina (%)	Média $\pm$ E.P.M. (%)
A	63,57 $\pm$ 4,80	60,35 $\pm$ 5,54	61,96 $\pm$ 3,45 ^A
B	49,07 $\pm$ 6,08	48,35 $\pm$ 3,56	48,71 $\pm$ 3,26 ^B
C	61,77 $\pm$ 4,82	60,60 $\pm$ 4,86	61,18 $\pm$ 3,18 ^A
D	44,40 $\pm$ 3,74	45,70 $\pm$ 5,16	45,05 $\pm$ 2,96 ^{BC}
E	48,72 $\pm$ 2,11	40,92 $\pm$ 4,60	44,82 $\pm$ 2,77 ^{BC}
F	57,15 $\pm$ 3,19	53,07 $\pm$ 5,91	55,11 $\pm$ 3,20 ^{AB}
Valor de P	>0,05	>0,05	< 0,0001
Média $\pm$ E.P. M	54,11 $\pm$ 2,15	51,50 $\pm$ 2,36	

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

A,B,C, letras diferentes na coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey.

Tabela 10: Média $\pm$ E.P.M. da porcentagem de espermatozoides com membrana plasmática lesada e acrossoma lesado (PLAL) de sêmen criopreservado adicionado ou não de insulina Pós-Percoll.

Touro	Controle (%)	Insulina (%)	Média $\pm$ E.P.M. (%)
A	15,12 $\pm$ 2,12	19,29 $\pm$ 5,21	17,20 $\pm$ 2,72 ^C
B	28,30 $\pm$ 49,9	27,45 $\pm$ 3,47	27,87 $\pm$ 2,82 ^A
C	14,90 $\pm$ 1,03	15,62 $\pm$ 2,18	15,26 $\pm$ 1,12 ^C
D	28,47 $\pm$ 2,75	27,12 $\pm$ 2,93	27,80 $\pm$ 1,18 ^A
E	22,62 $\pm$ 3,16	29,80 $\pm$ 4,86	26,21 $\pm$ 3,01 ^{AB}
F	23,85 $\pm$ 2,11	24,90 $\pm$ 2,12	24,37 $\pm$ 1,40 ^{AB}
Valor de P	>0,05	>0,05	P<0001
Média $\pm$ E.P.M	22,21 $\pm$ 1,57	24,03 $\pm$ 1,68	

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

A,B,C, letras diferentes na coluna significam diferença estatística pelo teste de Tukey.

O potencial de membrana mitocondrial não diferiu entre os tratamentos (insulina e controle), nem entre os touros, seja para o percentual de espermatozoides com alto (Tabela 11), intermediário (Tabela 12) e baixo (Tabela 13).

Tabela 11: Média $\pm$ erro padrão de espermatozoides com alto potencial de membrana mitocondrial das amostras de sêmen criopreservados com ou sem a adição de insulina.

Touro	Insulina (%)	Controle (%)	Média $\pm$ E.P.M. (%)
A	24,26 $\pm$ 8,53	22,92 $\pm$ 3,36	23,59 $\pm$ 4,25
B	30,40 $\pm$ 12,2	26,79 $\pm$ 13,8	28,59 $\pm$ 8,57
C	31,72 $\pm$ 10,3	29,02 $\pm$ 8,71	30,37 $\pm$ 6,30
D	25,49 $\pm$ 11,3	29,40 $\pm$ 12,5	27,44 $\pm$ 7,87
E	31,12 $\pm$ 7,39	29,70 $\pm$ 4,27	30,41 $\pm$ 3,96
F	39,74 $\pm$ 11,2	39,66 $\pm$ 16,85	39,70 $\pm$ 8,76
Média $\pm$ E.P.M	30,45 $\pm$ 3,87	29,14 $\pm$ 3,89	

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

Não houve diferença estatística, P>0,05.

Tabela 12: Média $\pm$ erro padrão de espermatozoides com intermediário potencial de membrana mitocondrial das amostras de sêmen criopreservados com ou sem a adição de insulina.

Touro	Insulina (%)	Controle (%)	Média $\pm$ E.P.M. (%)
A	53,45 $\pm$ 4,81	57,42 $\pm$ 2,29	55,43 $\pm$ 2,58
B	48,22 $\pm$ 10,4	49,27 $\pm$ 1,11	48,75 $\pm$ 7,07
C	49,32 $\pm$ 5,08	54,020 $\pm$ 6,55	51,67 $\pm$ 3,94
D	48,00 $\pm$ 8,20	41,65 $\pm$ 8,14	44,82 $\pm$ 5,48
E	43,10 $\pm$ 5,39	50,67 $\pm$ 7,64	46,88 $\pm$ 4,54
F	38,26 $\pm$ 11,9	38,70 $\pm$ 14,73	38,48 $\pm$ 8,47
Média $\pm$ E.P.M	47,09 $\pm$ 2,94	49,05 $\pm$ 3,38	-

Fonte: (ALMEIDA, 2020)

Não houve diferença estatística, $P>0,05$.

Tabela 13: Média $\pm$ erro padrão de espermatozoides com baixo potencial de membrana mitocondrial das amostras de sêmen criopreservados com ou sem a adição de insulina.

Touro	Insulina	Controle	Média $\pm$ E.P.M
A	23,10 $\pm$ 3,83	20,75 $\pm$ 1,75	21,92 $\pm$ 1,99
B	22,32 $\pm$ 2,16	24,60 $\pm$ 3,64	23,46 $\pm$ 2,00
C	19,60 $\pm$ 5,85	18,27 $\pm$ 4,74	18,94 $\pm$ 3,49
D	27,15 $\pm$ 4,85	19,76 $\pm$ 1,74	23,98 $\pm$ 3,06 ^a
E	20,26 $\pm$ 4,02	20,70 $\pm$ 4,58	20,51 $\pm$ 2,88
F	22,50 $\pm$ 4,66	19,92 $\pm$ 3,97	21,02 $\pm$ 2,80
Média $\pm$ E.P.M	22,59 $\pm$ 1,67	20,7 $\pm$ 1,41	

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

Não houve diferença estatística, $P>0,05$.

Também não foram notadas diferenças entre os tratamentos e entre os touros quanto ao índice de fragmentação de DNA, como apresentado na Tabela 14.

Tabela 14: Média $\pm$ erro padrão da fragmentação de DNA nas células espermática criopreservadas com diluidor acrescido ou não de 150 μ UI/mL de insulina.

Touro	Insulina	Controle	Média $\pm$ E.P.M
A	0,08 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01
B	0,06 $\pm$ 0,02	0,10 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01
C	0,07 $\pm$ 0,01	0,09 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01
D	0,08 $\pm$ 0,02	0,11 $\pm$ 0,01	0,10 $\pm$ 0,01
E	0,07 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01
F	0,09 $\pm$ 0,02	0,06 $\pm$ 0,01	0,08 $\pm$ 0,01
Média $\pm$ E.P.M	0,079 $\pm$ 0,008	0,091 $\pm$ 0,007	

Fonte: (ALMEIDA, 2020).

Não houve diferença estatística, $P > 0,05$.

3.4 DISCUSSÃO

A insulina é um hormônio metabólico que tem papel fundamental na regulação da homeostase do corpo e importante função na reprodução e no desenvolvimento inicial do embrião (LASKOWSKI et al., 2016). Além disso, a insulina atua sobre as células da linhagem espermática promovendo diferenciação durante a fase de espermatócito primário pela ligação dos receptores de IGF-I (NAKAYAMA et al., 1999). Os espermatozoides possuem receptores de insulina na membrana plasmática e acrossomal (SILVESTRONI et al., 1992). Diante disso, no atual trabalho pesquisou-se o efeito da adição da insulina ao diluidor de criopreservação do sêmen bovino e seus efeitos sobre a qualidade espermática e a capacidade de fecundação *in vitro*. Para investigar o efeito da insulina sobre o espermatozoide foram avaliadas as taxas de clivagem no D3, de blastocisto no D8 e de desenvolvimento embrionário, bem como a qualidade espermática foi avaliada, considerando motilidade, vigor, membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e fragmentação de DNA. O esperado era que a insulina fosse capaz de aumentar a taxa de clivagem, desenvolvimento embrionário e de blastocisto, porque deveria melhorar a qualidade espermática e consequentemente o poder fecundante do espermatozoide, porém os resultados

apresentados mostram que a insulina, neste estudo, não foi capaz de melhorar a qualidade espermática.

Sabe-se que a insulina é responsável em movimentar a glicose através da membrana plasmática para dentro da célula. A glicose, por sua vez, é responsável em fornecer energia para a célula espermática realizar suas funções como: motilidade, capacitação, penetração da zona pelúcida e fusão de membranas entre espermatozoide e ovócito (TRAVIS et al., 2001). Neste sentido, Tilburg (2006), mostrou que a insulina adicionada ao diluente de resfrieração do sêmen de ovino foi capaz de induzir o aumento na motilidade progressiva, retilinearidade, linearidade, e do batimento do flagelo, além disso, melhorou a integridade de acrossoma das células espermáticas, e conforme Shokri et.al. (2019), a insulina apresenta diminuição significativa na fragmentação de DNA em sêmen criopreservado de humano e aumento a motilidade.

Além da insulina apresentar efeitos benéficos na qualidade espermática, há estudos que relatam efeitos eficazes sobre a PIVE, quando adicionada concentração adequada ao meio de cultivo, melhorando o desenvolvimento embrionário na pré-implantação, devido a atividades miogênicas e antiapoptóticos (AUGUSTIN et al., 2003, BYRNE et al., 2002). Já no estudo de Mihalik et al. (2000), a insulina em meio SOF não teve efeito significativo sobre a taxa de desenvolvimento embrionário de bovinos e nem sobre o número de células nos blastocistos, mas em camundongo apresentou efeitos benéficos. Neste sentido, no presente estudo buscou-se avaliar se quando se utiliza sêmen criopreservado com diluidor acrescido de insulina, esta poderia apresentar um efeito benéfico sobre a PIVE. No entanto, neste estudo o acréscimo da insulina ao diluidor do sêmen não mostrou efeito sobre a taxa de clivagem, mas apresentou um efeito negativo sobre a taxa de blastocisto ($P=0,049$) e de desenvolvimento embrionário ($P=0,029$), nos quais se mostraram menores quando utilizados os espermatozoides criopreservados com insulina em relação ao controle. A utilização de insulina em meio de fecundação e no meio de cultivo pode aumentar o estresse oxidativo, conforme descrito por Barroso et al. (2006), que o estresse oxidativo pode resultar em falha ou atraso na fecundação e/ou desenvolvimento embrionário. Esta explicação é suportada pela afirmação de Laskowski (2017), de que o uso elevado de insulina pode aumentar o estresse oxidativo devido a sua função metabólica, causando várias mudanças que comprometem a sobrevivência do embrião como: alterações no fenótipo ou na expressão gênica devido a dependência da

insulina. Uma vez que este autor (LASKOWSKI, 2017) encontrou resultados semelhantes aos encontrados no presente estudo, notou que o aumento da insulina causou impacto negativo sobre a maturação dos oócitos e a taxa do desenvolvimento do blastocisto, enquanto a taxa de clivagem não apresentou nenhuma alteração.

No entanto, em outro estudo desenvolvido por Augustin et al. (2003) foi observado efeito positivo da insulina na taxa de clivagem, e no estudo de Ocana-Quero et al. (1998) a suplementação de insulina em meio de maturação apresentou efeito positivo na maturação nuclear, fertilização e na taxa de clivagem. Matsui et al. (1995a) sugerem que a suplementação de insulina ao meio de maturação melhora a taxa de clivagem (fecundação) pelo seu efeito sobre as células do *cumulus*, que é capaz de sintetizar glicosaminoglicanos, como o ácido hialurônico (BALL et al., 1982). O ácido hialurônico foi relatado por Handrow et al. (1982) como indutor da reação do acrossoma de bovinos, ou seja, é responsável por culminar com a capacitação espermática. No estudo de Matsui et al. (1995b), a suplementação de insulina no cultivo embrionário apresentou aumento na taxa de mórula avaliada no dia 5 (D5) após inseminação, com isso, parece melhorar o desenvolvimento do embrião. Esta melhora pode estar relacionada com a mudança na qualidade e quantidade da síntese de proteína para iniciar uma nova síntese de RNA entre 8 e 16 células (OCAÑA-QUERO et al., 1998), esses RNAs são importantes para atuar no desenvolvimento embrionário.

Para aumentar a compreensão dos resultados obtidos, os dados também foram avaliados considerando os efeitos de touro, uma vez que a suplementação da insulina poderia ter efeitos para ejaculados de determinados animais em detrimento de outros. Assim, o atual estudo mostrou efeito de touro sobre as taxas de clivagem, de blastocisto e de desenvolvimento embrionário, mostrando variação entre touros, confirmando os achados de Palma e Sinowantz (2004), que observaram diferenças entre touros para as taxas de clivagem e blastocisto. Contudo, a suplementação de insulina não diferiu entre os touros. Além disso, as taxas de clivagem, blastocisto e desenvolvimento embrionário dos touros, não foram relacionadas com a qualidade espermática pós-percoll.

Por fim, a insulina também não foi capaz de causar nenhum efeito sobre a qualidade espermática pós-percoll das amostras de sêmen; já que as características de motilidade, vigor, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e fragmentação de DNA não diferiram entre os grupos suplementados ou não com insulina. Por essa razão, acredita-se que a insulina não

foi capaz de influenciar os efeitos negativos na PIVE, sugere-se que a diminuição da taxa de blastocisto e de desenvolvimento embrionário possam estar relacionados com o cultivo, já que é uma das fases críticas que afeta diretamente o desenvolvimento embrionário, reduzindo a viabilidade e a qualidade do blastocisto o que pode refletir em redução na eficiência da implantação embrionária (YOUNG et al., 1998).

3.5 CONCLUSÃO

A insulina adicionada ao meio de criopreservação do sêmen, quando utilizado na PIV, não afeta a taxa de clivagem, mas causa efeitos negativos sobre as taxas de blastocisto e de desenvolvimento embrionário.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este estudo foi possível avaliar o efeito da insulina adicionado ao meio de criopreservação do sêmen sobre a produção de embriões *in vitro*, bem como seus efeitos sobre a qualidade espermática, com foco na motilidade, vigor, integridade das membranas plasmática e acrossomal, potencial de membrana mitocondrial e fragmentação do DNA espermático. A adição da insulina não causou efeitos sobre a taxa de clivagem, mas foi notado efeito negativo sobre a taxa de blastocisto e de desenvolvimento embrionário na PIV em bovinos. Além disso, foi notado efeito de touros sobre as taxas da PIV, apesar de não serem notados efeitos sobre a qualidade espermática.

REFERÊNCIAS

ABDELMONEIN, I.Y.; BETH, R.; SABA, K.; KENNETH, G.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, p. 207-214, 1998.

ACEVEDO, N.; DING, J.; SMITH, G. Insulin signaling in mouse oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 77, p. 872-879, 2007.

AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal Equine Veterinary Science**, v.7, p.145-173, 1987.

AMARAL, J.W., LEAL, D.R. Caracterização de Biotecnologias Aplicadas à Reprodução e Melhoramento Bovino em Luziânia-GO. **Núcleo Interdisciplinar de Pesquisa**. p.6, 2017.

AQUILA, S.; GENTILE, M.; MIDDE, E.; CATALANO, S.; ANDO, S. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. **Endocrinology** v.146, p. 552–557, 2005.

ANGRIMANI, D.S.R.; LOSANO, J.D.A.; RUI, B.R.; BICUDO, L.C.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Ferramentas para avaliação da funcionalidade da mitocôndria espermática. Revista. Brasileira. **Reprodução. Animal**. v.39, n.2, p.277-283, 2015.

ARRUDA, R.P.; CELEGHINI, E.C.C. Validação de uma técnica para avaliação simultânea das membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial de espermatozoides bovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, suplemento, v. 31, p. 230-231, 2003.

ASSUMPÇÃO, M.E.O.D; HAIPECK, K.; LIMA A.L; MELLO, M.R.B.; OLIVEIRA, J; OLIVEIRA, V.P.; TAVARES, L.M.T.; VISINTIN, J.A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p.149-156, 2002.

AUGUSTIN, R., POCAR, P., WRENZYCKI, C., NIEMANN, H.; FISCHER, B.; Mitogenic and anti-apoptotic activity of insulin on bovine embryos produced in vitro. **Reproduction** v.126, p.91–99, 2003.

BALL, G.D.; BERLLIN, M.E; Ax, R.L; and FIRST N.L. Glycosaminoglycans in bovine cumulus-oocytes complexes: morphology and chemistry. **Molecular Cell Endocrinology**, v. 28, n.1, p. 113-122, 1982.

BARROSO, G.; TAYLOR, S.; MORSHEDI, M.; MANZUR, F.; GAVIÑO, F.; et al. Mitochondrial membrane potential integrity and plasma membrane translocation of

phosphatidylserine as early apoptotic markers: a comparison of two different sperm sub-population. **Fertility and Sterility**, v. 85, p. 149-154, 2006.

BORGES, J.C., SILVA M.R., GUIMARÃES, J.D, ESPER C.R., FRANCESCHINI P.H. Membrana plasmática de espermatozoides bovinos: efeito de metabólitos do oxigênio, antioxidantes e criopreservação. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.3, p.303-314, jul./set. 2011.

BOUSQUET, D.; TWAGIRAMUNGU, H.; MORIN, N.; BRISSON, C.; CARBONEAU, G.; DUROCHER, J. In vitro embryo production in the cow: an effective alternative to the conventional embryo production approach. **Theriogenology**, v.51, p.59-70, 1999.

BUCCI, D.; GIL RODRIGUEZ, J. E.; VALLORANI, C.; SPINACI, M.; GALEATI.GIOVANNA, TAMANINI.C. GLUTs and Mammalian Sperm Metabolism **Journal of Andrology**, V 32, N. 4, p.348-355, 2011.

BREITBART, H., COHEN, G., RUBINSTEIN, S. Role of actin cytoskeleton in mammalian sperm capacitation and acrosome reaction. **Reproduction**, v. 129, p. 263-268, 2005.

BYRNE, A. T., SOUTHGATE, J., BRISON, D. R. & LEESE, H. J. Regulation of apoptosis in the bovine blastocyst by insulin and the insulin-like growth factor (IGF) superfamily. **Molecular Reproduction and Development**, v.62, n.4, p. 489-495, 2002.

CAMARA, D.R; GUERRA, M.M.P. Mitocôndria espermática: além da síntese de adenosina trifosfato (ATP). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32,n.2,p.93-99,2008.

CARREIRA, J.T. **Qualidade espermática e danos de DNA em espermatozoides criopreservação de touros nelore jovens, adultos e senis**. 2012 .101f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal 2012

CARVALHEIRA, J.B.C.; ZECCHIN, H.G.; SAAD, M.J.A. Vias de Sinalização da Insulina. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**.v.46, n.4,2002.

CASTRO, L.S.; SIQUEIRA, A.F.P.; HAMILTON, T.R.S.; MENDES, C.M.; VISINTIN, J.A.; ASSUMPÇÃO, M.E.O.A. Effect of bovine sperm chromatin integrity evaluated using three different methods on *in vitro* fertility. **Theriogenology**, v107, p.142. 148,2018.

CELEGHINI, E.C.C. **Efeitos da criopreservação do sêmen bovino sobre as membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial e estrutura da cromatina dos espermatozoides utilizando sondas fluorescentes**. 2005.188f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

CELEGHINI, E.C.C.; ARRUDA, R.P.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; RODRIGUES, P.H.M. 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.; ANDRADE, A.F.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F. Practical techniques for bovine sperm simultaneous fluorimetric assessment of plasma, acrosomal and mitochondrial membranes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.42, p.479-488, 2007.

DADOUNE, J.P. Expression of mammalian spermatozoal nucleoproteins. **Microscopy Research and Technique**, v.61, p.56–75, 2003.

DERIJCK, A.; VANDER HEIJDEN, G.; GIELE, M.; PHILIPPENS, M.; DE BOER, P. DNA double-strand break repair in paternal chromatin of mouse zygotes, the first cell cycles as an origin of de novo mutation. **Human molecular**, v.17, n.13, p.1922-1937, 2008.

DIAZ-PERES, E.; THOMAS, P.; MEIZEL, S. Evidence suggesting a role for sperm methalloendoprotease activity in penetration of zone-free hamster eggs by human sperm. **Journal of Experimental Zoological**, v. 248, p. 213-221, 1988.

D'OCCHIO M.J.; HENGSTBERGER K.J.; JOHNSTON S.D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival. **Animal Reproduction Science**, v.101, p.1-17, 2007.

ENGLAND, G.C.W. Cryopreservation of dog semen: a review. **Journal of Reproduction and Fertility (Supplement.)**, v. 47, p. 243-255, 1993.

EVENSON, D.P.; DARZYNKIEWICZ, Z.; MELAMED, M.R. Relation of mammalian sperm chromatin heterogeneity to fertility. **Science**, v.210, 4474, p. 1131-1133, 1980.

FABIAN, D; KOVÁ, I.L.; REHÁK, G; CZIKKOVÁ, S; BARAN, V; KOPPEL, J. Inhibitory effect of IGF-1 on induced apoptosis in mouse preimplantation embryos cultured in vitro. **Theriogenology**, v.61, p. 745-755; 2004.

FARLIN, M.E.; JASKO, D.J; GRAHAM, J.K.; SQUIRES, E.L. Assessment of Pisium sativum agglutinin in identifying acrosomal damage in stallion spermatozoa. **Molecular Reproduction Devices**, v.32, p.23-27, 1992.

FERNANDES, C.E. PIMENTEL C.A. Anormalidades de acrossomo e fertilidade em um garanhão: relato de um caso. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.27, n.2, p.345-349, 1997.

FONSECA, L.A. **Avaliação da descompactação da cromatina de espermatozoide bovinos por 3 diferentes métodos**. 2014. 52f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária ,Produção Animal) Universidade Federal Uberlândia, Minas Gerais, 2014.

FU, Z.; GILBERT, E.R.; LIU, D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. **Current Diabetes Reviews**; 9 (1): 25-53, 2013.

GARDNER, H.G.; KAYE, P.L. Insulin increases cell numbers and morphological development in mouse pre-implantation embryos in vitro. **Reproduction, Fertility and Development.**, v.3, n.1, p:79-91, 1991.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed, São Paulo: Roca, 2008. 395p.

GOSALVEZ, J.; FERNANDEZ, J.L.; GOYANES, V.; LÓPEZ-FERNANDEZ, C. Análisis de la fragmentación del ADN en espermatozoides mediante el test de dispersión de la cromatina (SCD). **Biotechnology**. v.1, p.38-51, 2006.

GOULÃO, I. **Actas bioquímico**, VII seminário-Diabetes, v.8, p.65-78, 2007.

GUEMRA et al. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, n.6, 2013.

GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GRAHAM, J.K.; KUNZE, E.; HAMMERSTEDT, R.H. Analysis of sperm cell viability, acrosomal integrity, and mitochondrial function using flow cytometry. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 55-64, 1990.

GRAVANCE, C.G.; GARNER, D.L.; BAUMBER, J.; BALL, B.A. Assessment of equine sperm mitochondrial function using JC-1. **Theriogenology**; v.53, n.9, p.1691-1703, 2000.

HANDROW, R. R.; LENZ, R.W.; and. AX, L.A. Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. **Biochemical Biophys Research Communications**, v.107, n.4, p 1326-1332, 1982.

HASSAN, H.R.; BOURRON, O.; HAJDUCH, E. Defect of insulin signal in peripheral tissues: Important role of ceramide. **World Journal Diabetes**, v.15, n.5 (3), p. 244-257, 2014.

HERRLER, A.; KRUSCHE, C.A.; BEIER, H.M. Insulin and insulin like growth factor-I promote rabbit blastocyst development and prevent apoptosis. **Biology of Reproduction**., v.59, n.6, p.1302-1310, 1998.

HOLT, W.V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science** v.18, n.62, p.3-22, 2000.

HU, J.H.; ZAN, L.S.; ZHAO, X.L.; LI, Q.W.; JIANG, Z.L.; LI, Y.K.; LI,X. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. **Journal of Animal Science**.v.88, p.1657-1662, 2010.

HUGHES, C.M.; MCKELVEY-MARTIN, V.J.; LEWIS, S.E.M. Human sperm DNA integrity assessed by Comet and ELISA assays. **Mutagenesis**, v.4, p.71-75, 1999.

IBGE, Instituto Brasileiro Geografia e estatística-Indicadores IBGE, **estatística da produção pecuária**- janeiro março .2018.

IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. Embryo Transfer Newsletter, v. 32, p. 14-26, 2014.

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

JEFFLEY, E.P.; ALAN, R.S. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v.106, p.165-169, 2000.

JENSEN.M.; DE MEYTS.P. Molecular mechanisms of differential intracellular signaling from the insulin receptor. **Vitamins and hormones**, v.80, p.51-75, 2009.

KAHN, B.B.; FLIER, J.S. Obesity and insulin resistance. **The Journal Clinical Investigation**, v.106, n.4, p.473-81, 2000.

KEZELE, P.R.; NILSSON, E.E.; SKINNER MK Insulin but not insulin-like growth factor-1 promotes the primordial to primary follicle transition. **Molecular Cellular Endocrinology** v.192, n. (1-2), p. 37-43,2002.

KOCH, J.U. Sperm migration in the human female genital tract with and without intrauterine devices. **Acta Europa Fertility** ,v.11,p.33-66,1980

LASKOWSKI, D. **Insulin and the early bovine embryo Influences on in vitro development, gene expression, and morphology** tese-2017,116f. (Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science), Swedish University of Agricultural Sciences Uppsala 2017.

LASKOWSKI, D.; SJUNNESSON, Y.; GUSTAFSSON, H.; HUMBLLOT, P.; ANDERSSON, G.; BÅGE, R. Insulin concentrations used in in vitro embryo production systems: a pilot study on insulin stability with an emphasis on concentrations measured in vivo. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v.58, n.1, v.66.2016.

LEE, M. S.; KANG, S. K; LEE, B. C.; HWANG, W. S. The beneficial effects of insulin and metformin on in vitro developmental potential of porcine oocytes and embryos. **Biology of Reproduction**, v.73, p.1264-1268, 2005.

LEIBFRIED, L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature in vitro. **Journal Animal Science**., v.48, p.76-86, 1979.

LEITE, P.A.; SCHREDER, G.G.; ALMEIDA, C.L.R; ZÚCCARI, C.E.S.N.; COSTA e SILVA, E.V. Criopreservação do Sêmen Bovino. UNOPAR. Cient 1879 **Ciências Biologia Saúde**, v. 13, p.279-86, 2011.

MANJUNATH, P.; NAUC, V.; BERGERON, A.; MÉNARD, M. Major proteins of bovine seminal plasma bind to the low-density lipoprotein fraction of hen's egg yolk. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 67, p. 1250-1258, 2002.

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; KANAGAWA, H. Effects of supplementation of the maturation media with insulin on in vitro maturation and in vitro fertilization of bovine oocytes. **Japanese Journal Veterinary Research**, v.43, p. 145-153, 1995a

MATSUI, M.; TAKAHASHI, Y.; HISHINUMA, M.; and. KANAGAWA, H.. Insulin and insulin-like growth factor-I (IGF-I) stimulate the development of bovine embryos fertilized in vitro. **Journal Veterinary Medical Sciences**, v.57, p.1109-1111, 1995b

MAXWEL, W.; WELC, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.1165-1178, 1997.

MEDEIROS, C.M.O.; FORELL, F.; OLIVEIRA, A.T.O.; RODRIGUES, J.L. 1922 Current status of sperm cryopreservation: Why isn't it better? **Theriogenology**, v. 57, n.1, p. 327 – 344, 2002.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

MERMILLOD, P.; DALBIÈS-TRAN, R.; UZBEKOVA, S.; THÉLIE, A.; TRAVERSO, J.M.; PERREAU, C.; PAPILLIER, P.; MONGET, P. Factors affecting oocyte quality: who is driving the follicle? **Reproduction in Domestic Animals**, v.43, n.2, p.393-400, 2008.

MIHALIK, J.; REHÁK, P.; KOPPEL, J. The influence of insulin on the in vitro development of mouse and bovine embryos. **Physiological Research**, v.49, n.3, p.347-54, 2000.

MILLER, D.; BRINKWORTH, M.; ILES, D. Paternal DNA packaging in spermatozoa: more than the sum of its parts? DNA, histones, protamines and epigenetics. **Reproduction**, v.139, p.287-301, 2010.

MOURA, A.A.; ANDRADE, C.R.; SOUZA, C.E.A.; RÊGO, J.P.A.; MARTINS, J.A.M.; OLIVEIRA, R.V.; MENEZES, E.B.S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.139-144, 2011.

MUECKLER, M.; THORENS, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. **Molecular Aspects of Medicine**, v.34, n.2-3 p.121-138, 2013.

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. **Developmental Biology**, V.43 p.343-347, 1999.

NICACIO, A.C. **Demandas tecnológicas dos sistemas de produção de bovinos de corte no Brasil**-Reprodução Animal Embrapa, Brasília 1ª edição, 2016.

NIEMANN, H. Cryopreservation of ova and embryos from livestock: current status and research needs. **Theriogenology**, v.35, p.109-124, 1991.

NISHI, M.; SANKE, T.; NAGAMATSU, S. et al. Islet amyloid polypeptide. A new beta cell secretory product related to islet amyloid deposits. **Journal of Biology Chemistry**; v.265 n.8, p.4173-4176, 1990.

OCAÑA QUERO, J.M., PINEDO-MERLIN, M., ORTEGA- MARISCAL, M., MORENOMILLAN, M. Influence of human and bovine insulin on in vitro maturation, fertilization and cleavage rates of bovine oocytes. **Archivos de Zootecnia**, v. 47, p. 85–93, 1998.

OLIVEIRA, B.M.M.; ARRUDA, R.P.; THOMÉ, H.E.; MATURANA FILHO, M.; OLIVEIRA, G.C.; GUIMARÃES, C.F.; 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, p.767–772, 2014.

PAIVA, M.C. O papel fisiológico da insulina e dos homeostase glicêmica. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica Funcional**.v.14 n.61,2014.

PALMA, G. A.; SINOWATZ, F. Male and female effects on the in vitro production of bovine embryos. **Anatomy, Histology and Embryology** , v. 33, p. 257-262, 2004.

PARRISH, J.J.; SUSKO-PARRISH, J.L.; WINER, M.A.; FIRST, N.L. Capacitation of bovine sperm by heparin. **Biology of Reproduction**, v.38, n.1, p.1171-1180, 1988.

PEREIRA, S.A. **Efeito da Presença da Insulina-Transferrina-Selênio (ITS) e L-ácido Ascórbico (AA) na Produção in vitro de Embriões Bovinos**. 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

PEREIRA, R.J.T.A., TULI, R.K., WALLENHORST, S., HOLTZ, W. The effect of heparin, caffeine and calcium ionophore A23187 on in vitro induction of the acrosome reaction in frozen-thawed bovine and caprine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 54, p. 185-192, 2000.

PONCHIROLLI, C.B. **Desenvolvimento de embrião bovino in vitro na presença de IGF-I, GH e insulina nos meios de maturação de ovócitos e cultivo embrionário**.2010.79f. Dissertação (Mestrado em medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária, UNESP, Botucatu, SP, 2010.

RAW, I. Mecanismo de ação da insulina. **Revista de Medicina**, p.199-210, 1948.

SAILER, B.L.; JOST, L.K.; EVENSON, D.P. Mammalian sperm DNA susceptibility to in situ denaturation associated with the presence of DNA strand breaks as measured by the terminal deoxynucleotidyl transferase assay. **Journal of Andrology**, v.16, n.1, p. 80-87,1997.

SCHULTZ, G.A.; HOGAN, A.; WATSON, A.J.; SMITH, R.M.; ANDHEYNER, S. Insulin, insulin-like growth factors and glucose transporters: temporal patterns of gene expression. in early murine and bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**.v.4, p.361–371,1992

SEAGER, S.W.J.; FLETCHER, W.S. Collection, storage, and insemination of canine semen. **Laboratory Animal Science**., p. 177-182, 1972

SIEME, H.; OLDENHOF, H.; WOLKERS, W.F. Mode of action of cryoprotectants for sperm preservation. **Animal Reproduction Science**.v.169, p 2-5,2016.

SIMÕES, R. **Influência da fragmentação de DNA espermático na produção in vitro de embriões bovino**.2010.106f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SHAHID, Z.; SINGH, G. Physiology, Islets of Langerhans. In: **StatPearls [Internet]**. Treasure P.8,2019.

SHOKRI, S., E; EBRAHIMI, S., M.; ZIAEIPOUR, S.; NETATBAKSH, R._Effect of insulin on functional parameters of human cryopreserved sperms. **Cryobiology**, v.87, p.68-73,2019.

SILVESTRONI, L.; MODESTI, A.; SARTORI, C. Insulin-sperm interaction: effects on plasma membrane and binding to acrosome. **Archives of Andrology**, v.28, p.201–211, 1992.

SILVA, P.F.N.; GADELLA, B.M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v.65, p.958-978, 2006.

SIQUEIRA, A.F.P. **Efeito de atributos espermáticos na produção *in vitro* de embriões bovinos**. 2016, 79p.Tese(Doutorado em Medicina Veterinária) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2016.

SPANOS, S.; BECKER, D.L.; WINSTON, R.M.; HARDY, K. Antiapoptotic action of insulin-like growth factor–I during human preimplantation embryo development. **Biology of Reproduction**.v.63, n.5, p.1413-1420, 2000.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W. GRAHAM, J.K.; VANDERWALL, D.K.; McCUE, P.M.; BRUEMMER, J.E. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, Colorado State University, Bulletin , 1999.

SUN, J.; JUIRISICOVA, A.; CASPER, R.F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization in vitro. **Biology of Reproduction**, v.56, p.602–607, 1997.

SZOLLOSI, D. Oocyte maturation, p.307-325. In: Thibault C., Levasseur C. & Hunter R.H.F. (Eds), **Reproduction in mammals and man**. Ellipses, Paris, 1993.

TANEJA, M.; BOLS, P.E.; VAN DE VELDE, A.; JU,J.C.; SCHREIBER,D; TRIPP,M.W.; LEVINE,H.;ECHELARD,Y.; RIESEN,J.;YANG,X. Developmental competence of juvenile calf oocytes in vitro and in vivo: influence of donor animal variation and repeated gonadotropin stimulation. **Biology of Reproduction**, v.62, n.1, p.206-213, 2000.

TENA-SEMPERE, M.; AND BARREIRO, M. L. “Leptin in Male Reproduction: The Testis Paradigm”. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.188, n. (1-2) p.9-13, 2002.

TILBURG, M.F.V. **Influencia da insulina no congelamento e resfriamento do semen ovino**.,2006,87p.Tese (Doutorado em Medicina Veterinária)- Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro,2006.

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

TRAVIS, A.J.; JORGEZ, C.J.; MERDIUSHEV, T.; JONES, B.H.; DESS, D.M.; DIAZ-CUETO, L.; et al. Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. **Journal of Biology Chemistry**. v.276, p. 7630–7636, 2001.

VALENTE, S.S.; PEREIRA, R.M.; BAPTISTA, M.C.; MARQUES, C.C.; VASQUES, M.I.; SILVA PEREIRA, M.V.; HORTA, A.E.; BARBAS, J.P. In vitro and in vivo fertility of ram semen cryopreserved in different extenders. **Animal Reproduction Science**. V.117, n.1-2 p.74-77,2010.

VARAGO, F.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte. v. 2, n. 32, p.100-109, 2008.

VIANA, J.H.M. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. **Embryo Transfer News**, v.36, n.4, p.8-25, 2018.

VIANA, J.H.M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. **O Embrião**, ano XVI, edição 51, p.6-10, 2012.

WANG, X; LIU,X; DUNN,R; OHL,D; SMITH,G. Glycogen synthase kinase-3 regulates mouse oocyte homologue segregation. **Molecular Reproduction and Development**, v.64, p.96–105, 2003.

WATSON, P.F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science** v.60-61, p.481-92, 2000.

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

WAWELL, W.M.C.; WELCH, G.R.; JOHNSON, L.A. Viability and membrane integrity of spermatozoa after dilution and flow cytometric sorting in the presence or absence of seminal plasma. **Reproduction, Fertility and Development**, v.8, p.1165-1178, 1997.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Celular Cryobiology: Thermodynamic and Mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, n.5, p. 436-450, 2001.

WURTH, Y.A.; KRIUP THAM. Bovine embryo production in vitro after selection of the follicles and oocytes. In: International Congress on Animal Reproduction, The Hague. Proceedings... The Hague: v.1, p.387-389,1992.

WRIGHT, E.M.; DONALD, D.; LOO, F.; BRUCE, A.H. Biology of Human Sodium Glucose Transporters. **Physiology Review**, v. 91, p.733–794, 2011.

WRIGHT, E.M. Glucose transport families SLC5 and SLC50.**Molecular Aspects of Medicine** v.34, n.2-3, p.186-193,2013.

YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. In: KNOBIL, A.; NEILL, J.D. **The physiology of reproduction**, New York: Raven Press. p. 189-317, 1994.

YASEEN M.A., WRENZYCKI C., HERRMANN D., CARNWATH J.W. & NIEMANN H.. Changes in the relative abundance of mRNA transcripts for insulin-like growth factor (IGF-I and IGF-II) ligands and their receptors (IGF-IR/IGF-IIR) in preimplantation bovine embryos derived from different in vitro systems. **Reproduction**. 122(4):601-610, 2001.

YOSHIDA, M. Conservation of sperm current status and new friends. **Animal 2211 Reproduction Science**, v. 60-61, p. 349-355, 2000.

YOUNG LE, SINCLAIR KD, WILMUT I, Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Revista Reprodução**, v.3, n.3, p.155–163, 1998.