

INFLUÊNCIA DA INSULINA NA CONGELABILIDADE DO SÊMEN DE OVINO

MAURICIO FRAGA VAN TILBURG,¹ JOSÉ FREDERICO STRAGGIOTTI SILVA,² ANGELO JOSÉ BURLA DIAS,³
CÉLIA RAQUEL QUIRINO⁴ E BRUNO FAGUNDES⁵

1. Doutor em Produção Animal na área de Biotecnologia da Reprodução pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
2. Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade de Hannover e professor associado da UENF
3. Doutor em Biociências e Biotecnologia e professor associado da UENF
4. Doutora em Melhoramento Genético Animal e professora associada da UENF
5. Doutor em Produção Animal na área de Biotecnologia da Reprodução pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

RESUMO

A insulina está presente no plasma seminal e pode envolver-se em eventos da capacitação e metabolismo autócrino do espermatozóide (AQUILA et al., 2005). Assim, estudaram-se os efeitos da insulina adicionada ao diluente de congelamento para sêmen e sua consequência na criopreservação, integridade de acrossoma e funcionalidade de membrana de espermatozóide ovino. A insulina foi adicionada na fração B do diluente TRIS-gema em diferentes concentrações. As avaliações da motilidade e cinemática realizaram-se às 0, 3 e 6 horas, enquanto a funcionalidade e integridade de membrana foram avaliadas às 0 e 6 horas após o descongelamento. A adição de 3,0 UI/mL de insulina aumentou ($P>0,05$) a amplitude lateral de ca-

beça ($5,42\pm 0,97$; C: $4,75\pm 0,47$) e acrossomas íntegros ($153,67\pm 16,98$; C: $134,00\pm 18,08$). A concentração de 0,3 UI/mL de insulina melhorou a retilinearidade, quando verificada no período de 3 horas ($83,17\pm 2,71$; C: $78,67\pm 4,97$). Nesse mesmo período, observou-se uma elevação nos valores de linearidade nas concentrações de 0,3 e 3,0 UI/mL de insulina ($52,17\pm 2,14$; $51,67\pm 3,14$; C: $46,83\pm 3,60$, respectivamente). Seis horas após o descongelamento, os tratamentos com 0,3 e 3,0 UI/mL apresentaram valores de acrossomas íntegros mais elevados ($146,17\pm 10,91$; $146,33\pm 16,02$; C: $117,00\pm 17,80$, respectivamente). A adição de insulina ao diluente aumentou a motilidade, cinemática e integridade de acrossoma do sêmen ovino congelado.

PALAVRAS-CHAVES: Congelamento, espermatozoides, insulina, ovino.

ABSTRACT

INFLUENCE OF INSULIN IN THE FREEZING OF THE OVINE SEMEN

Insulin is present on seminal plasma and it can be involved on sperm capacitation and sperm autocrine metabolism (AQUILA et al., 2005). It was verified the effect of insulin addition on ovine frozen semen extender. The parameters analyzed were sperm motility, sperm cinematic, acrossoma integrity and membrane functionality. Insulin was added to fraction B of TRIS-yolk extender in different concentrations. Sperm motility and cinematic were evaluated 0, 3 and 6 hours after thawing while acrossoma integrity and membrane functionality were evaluated 0 and 6 hours after thawing. The addition of 3 UI/mL of insulin increa-

sed amplitude lateral of head (5.42 ± 0.97 ; C: 4.75 ± 0.47) and acrossoma integrity (153.67 ± 16.98 ; C: 134.00 ± 18.08). The addition of 0.3 UI/mL of insulin improved retilinearity tree hours after thawing (83.17 ± 2.71 ; C: 78.67 ± 4.97). It was verified a increase on linearity values on treatments with 0.3 e 3 UI/mL (52.17 ± 2.14 ; 51.67 ± 3.14 ; C: 46.83 ± 3.60), respectively tree hours after thawing. Treatment with 0.3 e 3 UI/ml showed higher acrossoma integrity than control (146.17 ± 10.91 ; 146.33 ± 16.02 ; C: 117.00 ± 17.80). Addition of insulin on ovine frozen semen extender improved sperm motility, sperm cinematic and acrossoma integrity.

KEY WORDS: Freezing, insulin, ovine, spermetozoa.

INTRODUÇÃO

Os processos de criopreservação são conhecidos por gerar danos às células espermáticas, em particular às membranas, e induzir alterações similares à capacitação e reação acrossômica na população de espermatozóides sobreviventes (BAILEY et al., 2000). Em sêmen de carneiros têm-se observado que a criopreservação causa capacitação precoce após o descongelamento (WATSON, 1995) e que mudanças na membrana do espermatozóide podem não afetar a motilidade, mas encurtar a vida das células, reduzindo ou incapacitando a fertilização (MAXWELL & SALAMON, 2000).

Recentemente foi demonstrado que espermatozóides humanos são capazes de secretar insulina e que, naquelas células espermáticas não-capacitadas, a insulina está localizada ao nível subacrossomal, na peça intermediária e por toda a extensão do flagelo. Em meio onde a capacitação é estimulada, os espermatozóides secretam significativamente mais insulina do que em meio não-capacitante. Para estes autores, ainda é desconhecida a função da insulina liberada pelos espermatozóides; entretanto, postula-se que a insulina tenha um efeito autócrino no metabolismo da glicose e também possa estar envolvida nos eventos da capacitação espermática (AQUILA et al., 2005).

A insulina é um hormônio anabólico que promove a captação de glicose e aminoácidos, a síntese de proteínas e lipídeos e o aumento das funções intracelulares e da membrana plasmática (ABDELMONEIN et al., 1998). É uma proteína formada por duas cadeias (α e β), com 21 e 30 aminoácidos, respectivamente, conectadas por duas pontes dissulfetos. Embora haja alguma diferença na composição dos aminoácidos entre espécies, elas são pequenas, ou seja, as insulinas de bovinos, eqüinos, cães e baleias diferem apenas nas posições 8, 9 e 10 da cadeia α . Como resultado, as atividades da insulina não são espécie-específicas (CUNNINGHAM, 1997).

A concentração de insulina no plasma seminal de homens em jejum é $19 \pm 3 \mu\text{U/mL}$, sendo mais que duas vezes a concentração encontrada

no sangue dos mesmos doadores ($7,5 \pm 1,5 \mu\text{U/mL}$; HICKS et al., 1972) e a membrana plasmática e o acrossoma de espermatozóides apresentam receptores para a insulina (SILVESTRONI et al., 1992).

A energia utilizada pelo espermatozóide para iniciar os processos catabólicos e manter a motilidade, o balanço iônico e várias funções celulares vem através da glicólise. O espermatozóide conta, primariamente, com 90% de substratos extracelulares para satisfazer sua energia requerida. Eles metabolizam facilmente monossacarídeos, mas não metabolizam outros açúcares ou carboidratos complexos (DAVIES, 1999). No entanto, esses açúcares não penetram tão prontamente nas membranas celulares, sendo a presença de insulina essencial para a movimentação da glicose através da membrana plasmática, induzindo o aumento do número de proteínas transportadoras específicas (CUNNINGHAM, 1997).

A insulina e o fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-I) são hormônios polipeptídios essenciais para o metabolismo normal e a regulação do crescimento, mediante ligação com seus respectivos receptores transmembranares na superfície da célula-alvo (DUPONT et al., 2001). Esses peptídeos são capazes de se ligar cruzadamente com receptores de insulina (RI) e receptores de IGF-I (RIGF-I), sendo que a ligação entre peptídeo e receptor homólogo tem afinidade de 100 a 1.000 vezes maior que com peptídeos heterólogos (CLEMMONS, 1992).

Em ganhos sexualmente ativos, a motilidade espermática total tende a ser maior nos animais com altas concentrações de IGF-I. As taxas de prenhez foram superiores em cavalos com altas concentrações de IGF-I no plasma seminal, o que é sugestivo do efeito do IGF-I na função espermática (MACPHERSON et al., 2002). Trabalhos utilizando-se IGF-I demonstraram, *in vitro*, melhora significativa na motilidade total e progressiva dos espermatozóides de bovino (HENRICKS et al., 1998).

A insulina, por estimular a síntese de DNA, RNA, proteínas e lipídeos, e por aumentar as funções intracelulares e da membrana plasmática, pode melhorar a sobrevivência espermática

após o ciclo de congelamento e descongelamento (ABDELMONEIN et al., 1998).

O presente trabalho teve por finalidade verificar o efeito da insulina sobre a motilidade, a cinemática, a integridade de acrossoma e a funcionalidade de membranas espermáticas quando adicionada ao diluente de congelamento de sêmen ovino.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais

As amostras de sêmen foram obtidas de seis carneiros da raça Santa Inês, sadios e sexualmente maduros, com vagina artificial (IMV[®]), aquecida a 40-42°C, e mantidas, inicialmente, a 37°C, para avaliação de concentração, motilidade, cinemática, integridade de acrossoma e funcionalidade de membrana.

Avaliações seminais

Motilidade e cinemática

Realizou-se a avaliação da motilidade e cinemática pelo método computadorizado, utilizando-se o equipamento Hamilton Thorne Research, modelo Ceros 10,8 (CASA). Colocaram-se as amostras em uma lâmina termoestática, que mantém a temperatura a 37°C, e os cinco melhores campos analisados em microscópio de contraste de fase com aumento de 200x. Os parâmetros de motilidade avaliados foram a motilidade total (MT), a motilidade progressiva (MP), a retilinearidade (STR) e a linearidade (LIN). Para a cinemática, analisaram-se a velocidade média do percurso (VAP) em $\mu\text{m/s}$, a velocidade linear (VSL) em $\mu\text{m/s}$, a velocidade curvilínea (VCL) em $\mu\text{m/s}$, o deslocamento lateral da cabeça (ALH) em μm e a frequência de batida da célula (BCF) em Hz.

Integridade de acrossoma e funcionalidade da membrana

Para avaliação da integridade do acrossoma seguiu-se a técnica descrita por BATEMAN (2001), utilizando-se marcação dupla com iodeto de propídio (Sigma[®]) e a lectina *Pisum sativum*

conjugada com isotiocianato de fluoresceína (FITC-PSA, Sigma[®]). As células espermáticas foram classificadas em três categorias: acrossoma intacto (verde), acrossoma lesado (vermelho) e acrossoma semilesado (verde expandido ou irregular – *balloon*).

A funcionalidade da membrana espermática foi avaliada pela técnica do choque hiposmótico (DELL'AQUA JÚNIOR, 2000). Em ambos os testes de integridade de acrossoma e funcionalidade da membrana contaram-se 200 células por tratamento.

Protocolo de congelamento

As amostras seminais foram analisadas quanto à concentração inicial através da câmara de Neubauer e, em seguida, diluídas a uma concentração de 100×10^6 espermatozoides/mL na fração A do diluente TRIS-gema, constituído de 3,028 g de Tris (Sigma[®]) + 1,675 g de ácido cítrico (Sigma[®]) + 0,18 g de glicose (Sigma[®]) + 80 mL de H₂O destilada + 20 mL de gema + 0,031 g de penicilina (Sigma[®]) + 0,05 g de estreptomina (Sigma[®]) e divididas em cinco alíquotas de 1,0 mL. Resfriaram-se as alíquotas utilizando-se uma curva de -0,27°C/min, durante duas horas, até atingir 5°C, numa máquina de resfriamento de sêmen e embriões (HAAKE, modelo K75[®]). Em seguida adicionou-se a fração B do diluente Tris-gema, contendo 3,028 g de Tris (Sigma[®]) + 1,675 g de ácido cítrico (Sigma[®]) + 0,18 g de glicose (Sigma[®]) + 66 mL de H₂O destilada + 20 mL de gema + 0,031 g de penicilina (Sigma[®]) + 0,05 g de estreptomina (Sigma[®]) + 14 mL de glicerol (Sigma[®]) + 1 mL de OEP (*orvus et paste* - Equex[®]).

Quatro das cinco alíquotas de cada ejaculado receberam 0,003, 0,03, 0,3 e 3,0 UI/mL de insulina Regular Iolin[®] mista bovina e suína, altamente purificada, com concentração de 100 UI/mL, permanecendo em equilíbrio a 5°C por mais duas horas. Depois de decorrido o tempo de quatro horas (duas horas com a fração A e mais duas com a fração B), o sêmen foi envasado em palhetas de 0,5 mL previamente identificadas e colocadas em caixa de isopor a 6 cm do nível do nitrogênio líquido durante quinze minutos para serem congeladas, antes de serem imersas neste.

Avaliação espermática

O descongelamento das palhetas foi realizado em banho-maria a 37°C e, em seguida, avaliaram-se as amostras de sêmen quanto às características de motilidade, cinemática, integridade de acrossoma e funcionalidade de membrana. O sêmen descongelado permaneceu a 38°C em banho-maria por seis horas, ao abrigo da luz. Analisaram-se a motilidade e a cinemática três e seis horas após o descongelamento, enquanto a integridade de acrossoma e a funcionalidade de membrana seis horas pós-descongelamento.

Análise estatística

A análise dos dados realizou-se pelo teste “t” a 5% de significância, com o procedimento General Linear Models (PROC GLM) do programa SAS (1999).

RESULTADOS

A adição da insulina ao diluente de congelamento não resultou em diferença significativa ($P > 0,05$) dentre os tratamentos, para motilidade total (MT) e progressiva (MP), apesar de ser observada uma tendência de melhora na MP, conforme se aumentou a concentração de insulina no diluente, três horas após o descongelamento.

A adição de 0,3 UI/mL de insulina foi capaz de promover um aumento significativo ($P > 0,05$) para retilinearidade, enquanto que a linearidade aumentou com as concentrações de insulina de 0,3 e 3,0 UI/mL. Ambos os resultados observaram-se três horas após o descongelamento. Os demais tratamentos não apresentaram diferença significativa com relação à motilidade, à retilinearidade e à linearidade (Tabela 1).

TABELA 1. Médias e respectivos desvios-padrão do efeito do tratamento ao longo do tempo de incubação sobre as características da motilidade espermática pós-descongelamento de sêmen ovino

[Insulina] (UI/mL)	%MT ± DP	%MP ± DP	%STR ± DP	%LIN ± DP
Sêmen fresco	75,00±15,82	46,33±15,91	83,83±8,38	64,50±12,36
Zero hora pós-descongelamento.				
0 (controle)		16,83±10,83 ^a	81,50±4,09 ^a	52,17±6,55 ^a
0,003	39,20±17,91 ^a	12,40±9,45 ^a	81,20±6,14 ^a	50,20±7,33 ^a
0,03	47,20±16,45 ^a	20,20±9,63 ^a	79,80±4,15 ^a	48,60±5,37 ^a
0,3	42,83±19,16 ^a	16,00±8,29 ^a	81,83±2,56 ^a	49,67±2,80 ^a
3,0	45,17±22,22 ^a	18,50±15,45 ^a	80,83±5,38 ^a	49,83±6,08 ^a
Três horas pós-descongelamento.				
0 (controle)	45,67±14,60 ^a	13,17±8,01 ^a	78,67±4,97 ^a	46,83±3,60 ^a
0,003	39,00±13,17 ^a	15,40±12,48 ^a	81,00±3,67 ^{a,b}	47,40±2,51 ^a
0,03	48,20±18,74 ^a	19,20±12,99 ^a	80,60±1,95 ^{a,b}	48,20±3,27 ^{a,d}
0,3	39,17±11,58 ^a	19,33±11,27 ^a	83,17±2,71 ^b	52,17±2,14 ^{b,c}
3,0	43,50±24,64 ^a	22,50±15,0 ^a	82,33±2,16 ^{a,b}	51,67±3,14 ^{b,d}
Seis horas pós-descongelamento.				
0 (controle)	41,00±11,80 ^a	13,00±12,74 ^a	80,33±5,32 ^a	49,33±6,22 ^a
0,003	39,50±19,64 ^a	16,50±11,84 ^a	81,50±4,20 ^a	50,25±6,50 ^a
0,03	39,60±27,67 ^a	17,80±20,42 ^a	84,00±3,53 ^a	52,00±4,85 ^a
0,3	36,80±22,51 ^a	18,80±13,63 ^a	82,60±7,50 ^a	52,20±8,04 ^a
3,0	33,33±27,77 ^a	14,83±23,28 ^a	84,83±4,71 ^a	51,67±7,42 ^a

¹ Motilidade total (MT), motilidade progressiva (MP), retilinearidade (STR) e linearidade (LIN).

² Médias seguidas com a mesma letra não são diferentes pelo teste “t” a 5%.

³ Médias seguidas de diferentes letras apresentam diferenças pelo teste “t” a 5%.

A Tabela 2 resume os efeitos do tratamento após o descongelamento e incubação a 38°C, para a cinemática de espermatozóide de ovinos.

O aumento do deslocamento lateral de cabeça (ALH) foi observado nas amostras tratadas com 3,0 UI/mL de insulina, medido logo após o descongelamento, não havendo diferença signifi-

cativa ($P > 0,05$) para os demais tratamentos. No entanto, verificou-se diferença significativa ($P > 0,05$) para VSL e BCF nas amostras que receberam 0,003 e 0,3 UI/mL e 0,003 UI/mL de insulina, respectivamente, apenas quando analisadas três horas após o descongelamento (Tabela 2).

TABELA 2. Médias e respectivos desvios-padrão do efeito do tratamento ao longo do tempo de incubação sobre a cinemática dos espermatozóides do grupo 2 pós-descongelamento de sêmen ovino

Insulina] (UI/mL)	VAP ± DP	VSL ± DP	VCL ± DP	ALH ± DP	BCF ± DP
Sêmen fresco	92,53±14,88	81,90±18,59	122,62±19,31	3,75±1,15	14,55±6,25
Zero hora pós-descongelamento					
0 (controle)	59,30±10,32a	50,07±10,60a	94,75±11,31a	4,75±0,47a	28,58±3,42a
0,003	52,82±7,42a	44,54±8,21a	86,42±7,37a	4,82±0,71a,b	27,66±4,36a
0,03	58,58±12,22a	48,26±10,01a	97,48±16,46a	4,98±0,85a,b	28,12±2,71a
0,3	57,78±7,64a	48,35±6,67a	96,52±11,75a	5,27±0,46a,b	26,73±2,52a
3,0	55,20±7,42a	46,12±8,40a	91,42±9,52a	5,42±0,97b	27,66±2,73a
Três horas pós-descongelamento					
0 (Controle)	54,22±11,73a	43,83±11,39a,b	92,22±15,37a	5,27±0,67a	25,72±4,78a
0,003	49,18±15,97a	41,00±13,66a	85,38±24,89a	5,40±0,39a	29,24±3,47b
0,03	56,96±13,33a	47,36±11,25a,b	95,94±19,71a	5,14±0,54a	27,92±3,50a,b
0,3	59,07±12,70a	50,88±10,88b	95,32±19,72a	5,08±0,52a	28,20±2,65a,b
3,0	56,82±6,66a	48,38±6,26a,b	91,97±11,04a	4,80±0,52a	27,60±3,14a,b
Seis horas pós-descongelamento					
0 (Controle)	48,97±10,33a	40,43±10,21a	80,93±14,31a	3,93±1,01a	29,05±2,71a
0,003	54,27±14,58a	46,27±13,26a	88,82±18,47a	4,55±0,13a	28,30±3,28a
0,03	52,68±14,24a	45,60±12,01a	85,72±20,83a	4,74±0,32a	27,56±3,13a
0,3	53,38±16,17a	45,92±16,76a	85,12±20,16a	3,38±1,89a	29,32±3,31a
3,0	49,57±17,34a	43,57±16,76a	80,50±22,36a	4,66±0,44a	29,20±4,72a

¹ Velocidade média do percurso (VAP em $\mu\text{m/s}$), velocidade linear (VSL em $\mu\text{m/s}$), velocidade curvilínea (VCL em $\mu\text{m/s}$), deslocamento lateral da cabeça (ALH em μm) e frequência de batida da célula (BCF em Hz).

² Médias seguidas com a mesma letra não são diferentes pelo teste "t" em nível de 5%.

³ Médias seguidas de letras distintas apresentam diferenças pelo teste "t" em nível de 5%.

Após seis horas de incubação a 38°C, não existiu diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, apesar de eles apresentarem valores superiores ao controle para VAP, VSL e VCL.

A integridade de acrossoma apresentou melhora significativa após o descongelamento

no tratamento com 3,0 UI/mL de insulina e, após seis horas, nos tratamentos com 0,3 e 3,0 UI/mL de insulina. Os tratamentos não foram significativos para funcionalidade de membrana (Tabela 3).

TABELA 3. Médias de acrossomas íntegros e membranas funcionais e respectivos desvios-padrão do efeito do tratamento ao longo do tempo de incubação de sêmen ovino.

[Insulina] (UI/ mL)	PSA ± DP	Hiposmótico ± DP
Sêmen fresco	140,80±12,70	121,75±33,24
Zero hora pós-descongelamento		
0 (controle)		48,00±20,70a
0,003	122,40±21,05a	49,60±16,09a
0,03	135,17±9,76a	41,50±18,63a
0,3	135,17±18,39a	46,00±10,16a
3,0	153,67±16,98b	54,00±40,12a
Seis horas pós-descongelamento		
0 (controle)	117,00±17,80a	32,67±17,16a
0,003	135,20±18,10a,b	31,40±5,77a
0,03	125,00±13,76a	29,00±15,72a
0,3	146,17±10,91b	24,67±4,13a
3,0	146,33±16,02b	30,33±18,62a

¹ Médias seguidas com a mesma letra não são diferentes pelo teste "t" a 5%.

² Médias seguidas de distintas letras apresentam diferenças pelo teste "t" a 5%.

DISCUSSÃO

A glicose é uma substância que fornece energia para o espermatozóide realizar diferentes funções relacionadas à motilidade, capacitação, penetração da zona pelúcida e fusão de membranas entre espermatozóide e ovócito (TRAVIS et al., 2001). No entanto, esse açúcar não penetra tão prontamente nas membranas celulares, com exceção de poucos tecidos, tais como cérebro, fígado, leucócitos e hemácias, sendo a presença de insulina essencial para a movimentação da glicose através da membrana plasmática, induzindo o aumento do número de proteínas transportadoras específicas (CUNNINGHAM, 1997).

Apesar disso, a adição da insulina ao meio de congelamento não alterou a motilidade total dos espermatozóides de ovinos das amostras analisadas no presente experimento. A motilidade progressiva não apresentou diferença significativa, mas foi possível observar uma resposta dose-dependente, com a adição da insulina três horas após o descongelamento.

A motilidade espermática é um evento dependente da glicólise, pois aproximadamente 90% do ATP são produzidos por esta via em espermatozóides maduros. Além disso, as enzimas glicolíticas estão concentradas na peça principal, produzindo ATP adjacente ao sítio em que é requerido para manter a atividade flagelar (MUKAI & MAKOTO, 2004). O processo de resfriamento altera a fluidez da bicamada fosfolipídica, fazendo com que os fosfolipídeos semelhantes agrupem-se e excluam proteínas da membrana, diminuindo sua mobilidade e, assim, a funcionalidade da membrana (JASKO, 1994). O aumento da concentração de insulina pode promover maior captação de glicose pelas células espermáticas através da reposição das proteínas transportadoras de glicose, que provavelmente foram excluídas no processo de resfriamento, fornecendo maior quantidade de substrato para manutenção da atividade flagelar.

Nesse mesmo tempo de avaliação, observou-se que os parâmetros de retilinearidade (0,3 µUI de insulina/mL), linearidade (0,3 e 3,0 µUI de insulina/mL) e frequência da batida do flagelo (0,003 µUI de insulina/mL) foram significativamente ($P > 0,05$) maiores que o controle. Tem sido demonstrado que a frequência do batimento flagelar é proporcional à taxa de ATP hidrolisado pela dineína, enquanto o movimento flagelar é mantido constante (OKUNO & BROKAW, 1979), sugerindo que a glicólise na peça principal é crítica para a função normal do espermatozóide (TURNER, 2003).

Segundo MAXWELL & MORTIMER (2004), apenas espermatozóides com boa motilidade progressiva e alto deslocamento lateral da cabeça são capazes de penetrar no muco cervical, transpor a cérvix e alcançar o útero. Os espermatozóides do tratamento com 3,0 µUI/mL de insulina apresentaram, logo após o descongelamento, um aumento significativo nos valores de deslocamento lateral da cabeça.

AQUILA et al. (2005) demonstram que espermatozóides de ejaculados humanos são capazes de expressar e secretar insulina, sugerindo um possível envolvimento desta na indução da capacitação.

A hiperativação é definida como um padrão de movimento mostrado pela maioria dos espermatozoides no ato da fertilização *in vitro* e esses espermatozoides hiperativos tendem a movimentar-se vigorosamente em círculos (SUAREZ & HAN-CHEN, 2001). Entretanto, no presente experimento, a linearidade foi maior que 30% e o deslocamento lateral de cabeça menor que 9,0 μm para todas as concentrações de insulina, valores esses compatíveis com espermatozoides não-hiperativados (MAXWELL & MORTIMER, 1999).

O teste para avaliar a integridade acrossômica também revelou que, quanto maior a concentração de insulina no diluente de congelamento, maior a quantidade de espermatozoides com o acrossoma íntegro após o descongelamento. Esse resultado mostra que a insulina não induziu a reação acrossômica, e, sim, preservou a integridade desta após o descongelamento e no decorrer do período de incubação.

HICKS et al. (1972) mensuraram a concentração de insulina no plasma seminal de homens em jejum e verificaram que a concentração de insulina é mais que duas vezes a concentração encontrada no sangue dos mesmos doadores e, intrigantemente, a capacitação *in vitro* ocorre espontaneamente após a remoção do plasma seminal (STOJANOV et al., 2001). Isso sugere que a insulina possa estar implicada no mecanismo de capacitação do espermatozoide, pois durante o processamento do sêmen, quando o mesmo é diluído, a concentração de insulina presente no plasma seminal também é diluída, podendo ativar mecanismos que acarretem a capacitação precoce.

O fator mais importante de liberação da secreção de insulina é a concentração de glicose no meio. Nas células β das ilhotas pancreáticas, a glicose, através da cadeia respiratória, aumenta a quantidade de ATP pela oxidação. Dependendo dos níveis de glicose e, conseqüentemente, de ATP, este último controla o fechamento dos canais de K^+ e a despolarização da membrana plasmática. A despolarização faz com que os canais de Ca^{2+} abram-se e este íon flua para dentro da célula, provocando a liberação de insulina já

sintetizada (JEFFREY & ALAN, 2000), mecanismo esse semelhante à reação acrossômica no espermatozoide. O início da reação acrossômica também depende de um aumento intracelular massivo dos níveis de Ca^{2+} na célula espermática (BAILEY & BAYARD, 1994), assim como para a liberação de insulina (JEFFREY & ALAN, 2000). O Ca^{2+} extracelular é requerido na capacitação espermática e na indução da reação acrossômica (KAUL et al., 1997).

COLENBRANDER et al. (2000) mostraram que a glicose no diluente favorece a reação acrossômica em espermatozoides de cão e de *hamster*. AQUILA et al. (2005) demonstraram que a estimulação da secreção de insulina pela célula espermática é dose-dependente de glicose, assim como as células β do pâncreas. Provavelmente, na ausência de insulina no plasma seminal ou no diluidor, o espermatozoide é estimulado a liberar sua reserva de insulina para manter seu metabolismo. Esse processo acarreta a entrada de Ca^{2+} e, conseqüentemente, ativa os mecanismos da reação acrossomal. Com a adição de insulina nos diluentes de congelamento, os espermatozoides não precisariam liberar as suas reservas de insulina para captar a glicose do meio e, conseqüentemente, não acarretaria a entrada de Ca^{2+} neles e a ativação dos mecanismos da reação acrossomal.

Outra hipótese para justificar a ação da insulina em preservar a integridade acrossômica seria através do mecanismo que ocorre em alguns tipos celulares, como, por exemplo, nas células hepáticas, em que a insulina inibe a ligação do AMPc à proteína quinase dependente de AMPc (PKA) e, conseqüentemente, a sua ativação, demonstrando que a insulina pode diminuir a afinidade da proteína quinase dependente de AMPc (PKA) com o AMPc, baseado na especificidade da insulina em antagonizar essa ligação. Uma inibição similar da proteína quinase ativada tem sido observada no diafragma e no músculo esquelético (ROBERT & HENRY, 1987).

Também, a insulina em adipócitos humanos inibe a lipólise através da ativação da fosfoinosidase 3 quinase (PI-3K). A formação de fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato e fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato resulta no recrutamento e fosforilação

da proteína serina-treonina quinase B (PKB) pela 3'-fosfoinosidase-dependente quinase-1 (PDK1). A PKB fosforila e ativa a fosfodiesterase 3B (PDE 3B), comandando a redução de cAMP e inibição da lipólise (BINGZHONG et al., 2001). O aumento de AMPc ativa a PKA que, por sua vez, retira o colesterol da membrana plasmática espermática, ativa proteínas tirosina quinase e inibe proteínas tirosina fosfatases, mecanismos esses responsáveis pela capacitação e reação acrossômica (GADELLA & FLECH, 2000).

A capacitação é um processo multivariado que tem sido correlacionado com alterações no metabolismo celular, concentração intracelular de íons, fluidez da membrana plasmática, pH intracelular e concentração intracelular de AMPc (VISCONTI et al., 1998). Entretanto, ainda não são conhecidos os mecanismos de ação da insulina na célula espermática.

CONCLUSÕES

A adição de insulina no diluente de congelamento não mostrou citotoxicidade para espermatozoides ovinos, e os resultados são promissores na manutenção da integridade acrossomal, motilidade e cinemática das células espermáticas no período decorrente ao descongelamento. Entretanto, cabe realizar mais estudos para verificar em qual mecanismo metabólico a insulina atua e sua correlação com a fertilidade.

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. 207-21, 1998.
- AQUILA S.; GENTÍLE M.; MÍDDEA E.; CATALANO S.; ANDO S. Autocrine regulation of insulin secretion in human ejaculated spermatozoa. **Endocrinology**, v. 146, n. 2, p. 552-557, 2005.
- BAILEY, J.L.; BILODEU, J. F.; CORMIER, N. Semen cryopreservation in domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. **Journal of Andrology**, v. 21, p. 1-6, 2000.
- BAILEY, J. L.; BAYARD, T. S. Calcium influx into mouse spermatozoa activated by solubilized mouse zona pellucida, monitored with calcium fluorescent indicator, Fluo-3. Inhibition of the influx by three inhibitors of the zona pellucida induced acrosome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin and 3-quinuclidinyl enzilate. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, p. 297-308, 1994.
- BINGZHONG, X.; ANDREW, G. G.; FREDERIC, B. K.; MICHAEL B. Z. Mechanism of intracellular calcium ($[Ca^{2+}]$) inhibition of lipolysis in human adipocytes. **The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, September 17, v. 10.1096/fj.01-0278fje, 2001.
- BATEMAN, H.L. **Effects of semen extender composition and cooling methods on canine sperm function and cryo-survival**. 2001. Thesis (Master of Science) – University of Guelph, Guelph, 2001.
- CLEMMONS DR. IGF binding proteins: regulation of cellular actions. **Growth Regulation**, v. 2, p. 80-87, 1992.
- COLENBRANDER, B.; SIRIVAIDYAPONG, F. P. C.; CHENG, F.P.; MARKS, A.; VOORHOUT, W. F.; BEVERS, M. M. Effect of sperm diluents on the acrosome reactoin in canine sperm. **Theriogenology**, v. 53, p. 789-802, 2000.
- CUNNINGHAM, D. V. M. **Tratado de fisiologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
- DAVIES MOREL, M. C.G. **Equine artificial insemination**. Oxon, UK: Cabi Publishing, Walling Ford, 1999.
- DELL' AQUA JÚNIOR. **Efeito de centrifugação, tipos de envase e temperatura de congelamento sobre os parâmetros espermáticos e índices de fertilidade relacionados com o local de deposição e concentração da dose inseminante do sêmen congelado eqüino**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária: Área de Reprodução Animal) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2000.
- DUPONT, J.; KHAN, J.; QU BAO-HE; METZLER, P.; HELMAN, L; LEROITH, D. Insulin and IGF-I induce different patterns of gene expression in mouse fibroblast NIH-3T3 cells: identification by cDNA microarray analysis. **Endocrinology**, v. 142, n. 11, p. 4968-4975, 2001.
- GADELLA, B. M.; FLESCHE, F. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1469, p. 197-235, 2000.

- GRAHAM, J. K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed sêmen. **Theriogenology**, v. 64, n. 3, p. 492-504, 2005.
- HENRICKS, D.M.; KOUBA, A.J.; LACKEY, B.R.; BOONE, W.R.; GRAY, S.L.L. Identification of insulin-like growth factor-I in bovine plasma and its receptor on spermatozoa: influence on sperm motility. **Biology Reproduction**, v. 59, p. 330-337, 1998.
- HICKS, J. J.; ROJAS, L.; ROSADO, A. Insulin regulation of spermatozoa metabolism. **Endocrinology**, v. 92, n. 33, p. 833-837, 1972.
- JASKO, D. J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinaria**, v. 10, p. 180-190, 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.
- KAUL, G.; SINGH, S.; GANDHI, K. K.; ANAND, S. R. Calcium requirement and time course of capacitation of goat spermatozoa assessed by chlortetracycline assay. **Andrologia**, v. 29, n. 5, p. 243-251, 1997.
- MACPHERSON, M.L.; SIMMEN, R.C.M.; SIMMEN, F.A.; HERNANDEZ, J.; SHEERIN, B.R.; VARNER, D.D.; LOOMIS, P.; CADARIO, M.E.; MILLER, C.D.; BRINSKO, S.P.; RIGBY, S.; BLANCHARD, T.L. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 equine seminal plasma: Association with sperm characteristics and fertility. **Biology Reproduction**, v. 67, p. 648-654, 2002.
- MAXWELL, W. M. C.; MORTIMER, S. T. Effect of medium on the kinematics of frozen-thawed ram spermatozoa. **Society for Reproduction and Fertility**, v. 127, p. 285-291, 2004.
- MAXWELL, W. M.; SALAMON, S. Storage of ram semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, p. 77-111, 2000.
- MAXWELL, W. M. C.; MORTIMER, S. T. Kinematic definition of ram sperm hyperactivation. **Reproduction Fertility**, v.11, n. 1, p. 25-30,1999.
- MUKAI, C.; MAKOTO, O. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 540-547, 2004.
- OKUNO, M.; BROKAW, C. J. Inhibition of movement of triton-demembrated sea-urchin sperm flagella by Mg^{2+} , ATP4-, ADP and P1. **Journal Cell Science**, v. 38, p. 105-123, 1979.
- ROBERT, A. G.; HENRY, A. L. Insulin inhibition of hepatic cAMP-dependent protein kinase: decreased affinity of protein kinase for cAMP and possible differential regulation of intrachain sites 1 and 2. **Biochemistry**, v. 84, p. 2218-2222, 1987.
- SAS, PROG GLM. **Statistical Analysis System**. New York: Inc, Cary, 1999.
- SILVESTRONI, L.; MODESTI, A. SARTORI, C. Insulin-sperm interaction: effects on plasma membrane and binding to acrosome. **Archives of Andrology**, v. 3, p. 201-211, 1992.
- STOJANOV, W.U. C.; CHAMI, O.; ISHII, S.; SHIMIZU, T.; LI A.; O'NEILL, C.; SHIMUZU, T. Evidence for the autocrina induction of capacitation of mammalian spermatozoa. **Journal Biological Chemistry**, v. 276, p. 26962-26968, 2001.
- SUAREZ, S. S.;HO HAN-CHEN. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v. 122, p. 519-526, 2001.
- TRAVIS, A.J.; JORGEZ, C.J.; MERDIUSHEV, T.; JONES B.H; DESS, D.M.; DIAZ-CUETO, L.; STOREY, B.T.; KOPF, G.S.; MOSS, S.B. Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. **Journal Biological Chemistry**, v. 276, p. 7630-7636, 2001.
- TUNNER, R. M. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? **Journal of Andrology**, v. 24, p. 790-803, 2003.
- VISCONTI, P. E.; GALANTINO-HOMER, H; MOORE, G. D.; BAILEY, J. L.; NING, X.; FORNES, M.; KOPF, G. S. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v. 19, p. 242-248, 1998.
- WATSON, P. F. Recente developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. **Reproduction and Fertility Devices**, v. 7, p. 871-891, 1995.