



## Adição de insulina ao meio crioprotetor seminal de garanhões Mangalarga Marchador<sup>1</sup>

Bruno Fagundes<sup>2</sup>, Maurício Fraga van Tilburg<sup>2</sup>, José Frederico Straggiotti Silva<sup>2</sup>, Aldo Shimoya<sup>3</sup>, Marcus Antonio Pessanha Barreto<sup>2</sup>, Vinicius Motta Ferreira<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Projeto financiado pela Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Campos dos Goytacazes, RJ.

<sup>2</sup> Universidade Estadual do Norte Fluminense - Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal.

<sup>3</sup> Universidade Salgado de Oliveira – UNIVERSO Campos, RJ.

**RESUMO** - Objetivou-se verificar o efeito da adição de insulina (0,1; 1 ou 10 UI/mL) ao diluente de congelamento convencional por meio de análise computadorizada das características de motilidade espermática (CASA), funcionalidade da membrana plasmática, por meio de choque hiposmótico, e integridade de membrana acrossomal, avaliada pelo teste FITC/PSA. Não houve efeito significativo da adição de 0,1 e 1 UI/mL de insulina na análise imediata após o descongelamento sobre os parâmetros de motilidade e cinemática espermática, porém o nível de 10 UI/mL de insulina promoveu redução desses parâmetros.

Palavras-chave: congelamento, equino, espermatozoide, membrana plasmática

## Adding insulin to frozen seminal extender from Mangalarga Marchador stallions

**ABSTRACT** - Success rates in equine sperm cryopreservation are lower than in other domestic species. The objective of this study was to verify the effect of adding 0.1 IU/mL, 1 IU/mL and 10 IU/mL insulin to conventional frozen extender using computerized analysis of sperm motility (CASA), plasma membrane functionality by hypo-osmotic shock and acrosomal membrane integrity through the FITC/PSA assay. No difference was observed in treatment with 0.1 and 1 IU/mL after thawing in the analysis of motility and kinematic sperm parameters. However, when 10 IU/mL insulin was used there was a reduction in these parameters.

Key Words: equine, freezing, plasmatic membrane, sperm

### Introdução

Existe uma grande diferença na congelabilidade do sêmen entre garanhões e até mesmo entre ejaculados de um mesmo garanhão (Pickett & Amann, 1993). Essa diferença também ocorre entre raças e a grande maioria dos garanhões Mangalarga Marchador é classificada como maus congeladores quando se utiliza apenas o glicerol como crioprotetor (Gomes et al., 2002). Alvarenga et al. (1996) observaram que a congelabilidade do sêmen de garanhões Mangalarga Marchador foi pior que a do sêmen de garanhões de salto e da raça Quarto de Milha.

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). Esse hormônio polipeptídico é essencial para o metabolismo

normal e a regulação do crescimento mediante ligação com seu respectivo receptor transmembrana ou com receptores de IGF (fator de crescimento semelhante à insulina) na superfície da célula-alvo (Dupont et al., 2001). Hicks et al. (1972) observaram que a concentração de insulina no plasma seminal humano é quase três vezes maior que no sangue, o que sugere alguma função seminal. Kremer (1965), citado por Hicks et al. (1972), observou que, quando se utilizam glicose ou piruvato como substrato, a adição de insulina aumenta significativamente a motilidade de espermatozoides humanos, o que não ocorreu quando se utilizou frutose. Aitken (1994) relatou que hormônios, citosinas e fatores de crescimento presentes no plasma seminal afetam a motilidade espermática e a fertilização. Aquila et al. (2005) mostraram que espermatozoides humanos podem expressar e secretar insulina, o que sugere uma regulação autócrina do metabolismo da glicose, a qual é provida ao espermatozoide

pelo plasma seminal e pelo fluido do trato reprodutivo da fêmea (Koch, 1980, citado por Aquila et al., 2005). Macpherson et al. (2002) observaram que a motilidade espermática total e a taxa de prenhez são maiores em garanhões com altas concentrações de IGF-I no plasma seminal. Van Tilburg et al. (2008) constataram melhora na integridade de acrossoma e na motilidade após o teste de termorresistência com a adição de insulina ao diluente de congelamento seminal ovino.

Este trabalho foi conduzido com a finalidade de verificar o efeito da insulina sobre a motilidade, a cinemática, a integridade de acrossoma e a funcionalidade de membranas espermáticas adicionadas ao meio crioprotetor seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador.

### Material e Métodos

Foram utilizados cinco garanhões da raça Mangalarga Marchador provenientes do haras Lugavi em Campos dos Goytacazes - RJ. Inicialmente foram realizadas cinco coletas de sêmen de cada garanhão com intervalo de 2 dias, a fim de eliminar células espermáticas armazenadas por longo período. Em seguida, foram coletados três ejaculados de cada animal para realização deste trabalho.

O sêmen foi obtido utilizando-se uma vagina artificial modelo Hannover com a temperatura de 42 °C e uma égua em cio natural como manequim. A porção gelatinosa proveniente das vesículas seminais foi removida ao ficar retida no filtro de coleta.

A concentração espermática foi determinada com auxílio de uma câmara de Neubauer utilizando-se uma amostra do sêmen diluída na proporção de 1:200 de solução formol citrato preparada com 2,94 g de citrato de sódio em 100 mL de água destilada, removendo-se 4 mL desta solução e adicionando 4 mL de formaldeído (Merck®).

O sêmen foi diluído em meio de resfriamento contendo 10 g de leite desnatado Molico® (Nestle®) e 0,4 g de AGROVET® (Novartis®) diluídos em 100 mL de água destilada q.s.p. na proporção de uma parte de sêmen para duas de diluente e em seguida foi centrifugado a 600 g, durante 10 minutos, à temperatura ambiente. Cerca de 10 a 20% do diluente de resfriamento com o plasma seminal foi preservado para ressuspensão com o diluente de congelamento proposto por Vidament et al. (2002) com modificações, contendo 50 mL de lactose 11%; 25 mL de glicose-EDTA (12 g de glicose; 0,240 g de carbonato de sódio; 0,740 g de EDTA; 0,750 g de Citrato de sódio dihidratado; 0,8 g de AGROVET® (Novartis®); 200 mL de água destilada q.s.p); 20 mL de gema de ovo; 3 mL de

glicerol; 2 mL de dimetilformamida; 0,5 mL de Equex® - Farmacia, *Orvus et paste*. Todos os demais reagentes descritos acima foram obtidos pela empresa VETEC.

Avaliou-se a adição de insulina ao diluente de congelamento (Iolin® mista bovina e suína altamente purificada com concentração de 100 UI/mL) da seguinte maneira: controle, 0,1 UI/mL, 1 UI/mL e 10 UI/mL. Os parâmetros de motilidade e cinemática espermática foram avaliados utilizando-se o programa Ceros, versão 10.8, da Hamilton Thorn Research (HTM-CEROS), de funcionalidade de membrana plasmática pelo teste hiposmótico (Dell'acqua Jr. et al., 2001) e de integridade de membrana acrossomal pelo teste FITC-PSA.

A ressuspensão do sedimento de espermatozoides foi feita acrescentando-se o diluente de congelamento de acordo com os tratamentos, de forma a se obter uma concentração de  $100 \times 10^6$  células/mL. O envase do sêmen foi feito em palhetas de 0,5 mL, que foram mantidas em repouso por 20 minutos a 4 °C e em seguida, colocadas a 4 cm acima do nível do nitrogênio líquido durante 10 minutos e imersas neste criogênio para armazenamento.

A integridade funcional da membrana espermática foi avaliada por choque hiposmótico utilizando-se a técnica desenvolvida por Dell'acqua Jr. et al. (2001) modificada. Em um tubo foram adicionados 190 mL de água bidestilada a 38 °C e 10 µL do sêmen descongelado. A amostra foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 38 °C e em seguida foi colocada uma gota sobre a lâmina recobrimo-a com uma lamínula para análise em microscópio de contraste de fase com aumento de 400X. Foram contadas 200 células espermáticas, considerando funcionais aquelas com cauda enrolada e não-funcionais aquelas que permaneceram com a cauda esticada.

A integridade do acrossoma foi avaliada utilizando-se a fluoresceína isotiocianato conjugada com a Lectina Pisum sativum aglutinina (FITC-PSA), a qual se liga à glicoconjugados da membrana acrossomal externa ou à matriz acrossomal (Bedford et al., 2000) em associação ao iodeto de propídeo.

Após a análise da funcionalidade da membrana, motilidade e cinemática espermática, o sêmen descongelado foi centrifugado a 200 g por 2 minutos para remoção do diluente de congelamento e adição de PBS. Em seguida, foram preparados esfregaços das amostras, que foram secos à temperatura ambiente e mergulhados em metanol resfriado a -10 °C no congelador por 30 segundos e novamente secos a temperatura ambiente. Foram colocados sobre cada lâmina 60 µL de FITC-PSA sob proteção de luminosidade. Em seguida, as lâminas foram cobertas com

um pedaço de transparência para retroprojeção e incubadas por 20 minutos. Cada lâmina foi adicionada de iodeto de propídio (60  $\mu$ L) e novamente coberta com um pedaço de transparência para retroprojeção e incubada por 10 minutos. As lâminas foram lavadas com PBS e cobertas com lamínula para observação em microscópio com ultra-violeta (UV) com aumento de 100X. Foram contadas 200 células por lâmina, classificadas como acrossoma íntegro (verde uniforme), parcialmente reagido (*balloon* ou danificado) e reagido (vermelho). O comprimento de onda utilizado na observação foi de 540 nm e todos os reagentes utilizados foram obtidos pela Sigma-Aldrich.

Os parâmetros de motilidade e cinemática espermática foram determinados por avaliação computadorizada utilizando-se o programa Ceros, versão 10.8, da *Hamilton Thorne Research* (HTM-CEROS, 1999). Uma câmara de contagem de 20  $\mu$ L (*Hamilton Thorne Research*) pré-aquecida pela placa de platina aquecedora ( $\pm 37$  °C) foi utilizada para observação da amostra seminal por microscópio ótico com aumento de 100 vezes acoplado ao computador. A intensidade da fonte de luz foi ajustada para que as imagens dos espermatozoides fossem capturadas e digitalizadas para análise pelo programa.

Foram escolhidos quatro campos que apresentavam melhor motilidade aparente na amostra para análise e a média desses valores foi anotada e salva pelo programa para análise estatística.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e os tratamentos comparados pelo teste F. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional Genes (Cruz, 2006) para determinação do efeito dos níveis de insulina dos garanhões e das coletas de sêmen.

## Resultados e Discussão

A adição de insulina (0,1 e 1 UI/mL) ao diluente de congelamento não promoveu diferença significativa nas

análises de motilidade espermática, mas a adição de 10 UI/mL diminuiu a motilidade total e motilidade progressiva (Tabela 1).

A principal fonte de energia para o espermatozoide realizar diferentes funções relacionadas à motilidade, capacitação, penetração da zona pelúcida e fusão de membranas entre espermatozoide e ovócito é pela glicose (Travis et al., 2001). Entretanto, esse açúcar não penetra imediatamente nas membranas celulares, com exceção de poucos tecidos, como cérebro, fígado, leucócitos e hemácias, e a presença de insulina é essencial para movimentação da glicose pela membrana plasmática, induzindo o aumento do número de proteínas transportadoras específicas (Cunningham, 1997).

A adição da insulina ao meio de congelamento não melhorou a motilidade espermática na análise imediatamente após o descongelamento. Provavelmente isso ocorreu pelo curto tempo para penetração da glicose nas membranas espermáticas. Van Tilburg et al. (2008) verificaram que a adição de insulina melhorou os parâmetros de linearidade e retidão na análise após três horas do descongelamento, porém o efeito na análise imediata após o descongelamento também não melhorou os valores de motilidade. Uma provável razão para o efeito negativo da adição de 10 UI/mL de insulina sobre a motilidade total e progressiva é que o volume utilizado corresponde a pouco menos que 10% do volume do diluente utilizado, desse modo, pode não ter ocorrido interação adequada entre os crioprotetores desse meio com as células espermáticas.

A adição de 0,1; 1 e 10 UI/mL de insulina ao diluente de congelamento não teve efeito sobre a velocidade da cinemática espermática, mas a adição de 10 UI/mL de insulina diminuiu a amplitude lateral de cabeça em relação aos grupos controle e 0,1 UI/mL de insulina e aumentou a frequência de batimento flagelar em comparação à ausência de insulina (Tabela 2).

Correlações positivas altamente significativas entre motilidade progressiva e os parâmetros de velocidade indicam que o espermatozoide com trajeto linear progressivo e reto percorre uma distância maior em menor espaço de

Tabela 1 - Motilidade espermática imediatamente após o descongelamento do sêmen de garanhões Mangalarga Marchador criopreservado em meio contendo insulina

[Insulina] UI/mL	Motilidade total (%)	Motilidade progressiva (%)	Retidão (%)	Linearidade (%)
0 (Controle)	31,6 $\pm$ 18,0a	19,8 $\pm$ 12,0a	78,3 $\pm$ 3,6a	45,2 $\pm$ 3,7a
0,1	32,5 $\pm$ 17,9a	20,8 $\pm$ 12,3a	79,3 $\pm$ 3,2a	46,7 $\pm$ 4,4a
1	31,6 $\pm$ 18,5a	20,8 $\pm$ 13,3a	78,9 $\pm$ 4,0a	46,5 $\pm$ 4,3a
10	24,5 $\pm$ 15,9b	15,7 $\pm$ 10,5b	80,0 $\pm$ 6,0a	45,7 $\pm$ 5,3a
Média geral	30,0	19,3	79,1	46,0

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Tabela 2 - Cinemática espermática no sêmen de garanhões Mangalarga Marchador criopreservado em meio com insulina

	Insulina				Média geral
	0 UI/mL (controle)	0,1 UI/mL	1 UI/mL	10 UI/mL	
Velocidade média do percurso (im/s)	55,9 ± 11,1a	55,8 ± 11,9a	55,0 ± 11,5a	52,0 ± 12,3a	54,7
Velocidade linear (im/s)	44,3 ± 9,4a	45,0 ± 10,5a	43,7 ± 10,0a	42,2 ± 11,0a	43,8
Velocidade curvilínea (im/s)	92,0 ± 27,5a	96,9 ± 18,9a	95,9 ± 20,3a	92,4 ± 19,7a	94,3
Amplitude lateral de cabeça (im)	5,2 ± 0,6a	5,1 ± 0,7a	5,0 ± 0,9ab	4,8 ± 1,0b	5,0
Frequência de batimento flagelar (Hz)	22,3 ± 6,4b	23,2 ± 6,7ab	23,3 ± 7,9ab	25,4 ± 7,0a	23,6

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

tempo. A velocidade média do percurso (VAP) e a velocidade linear (VSL) também têm forte correlação positiva com a fertilidade e podem ser utilizadas para estimar a fertilidade de amostras seminais (Kathiravan et al., 2008).

Com o aumento da concentração de insulina, houve queda na amplitude lateral da cabeça do espermatozoide, aumentando a frequência de batimento flagelar. Desse modo, os espermatozoides tiveram melhor aproveitamento energético durante seu trajeto. Mortimer (1997) reportou que o aumento na viscosidade do diluente diminui a amplitude da onda flagelar. Geralmente, amplitude lateral de cabeça elevada não é desejável porque afeta a progressão celular, desse modo, valores mais elevados de ALH denotam menor qualidade da amostra seminal (Arruda et al., 2003).

Rathi et al. (2001) postularam que a amplitude lateral da cabeça e a velocidade curvilínea aumentam em espermatozoides equinos hiperativados em meio contendo agentes capacitantes, como bicarbonato e  $\text{Ca}^{2+}$  ionóforo. Esses autores concluíram que espermatozoides equinos hiperativados apresentam  $\text{VCL} \geq 180 \mu\text{m/s}$  e  $\text{ALH} \geq 12 \mu\text{m}$ , o que não ocorreu neste experimento.

A adição de 0,1; 1 e 10 UI/mL de insulina ao diluente de congelamento também não teve efeito sobre as análises de funcionalidade de membrana plasmática e integridade de membrana acrossomal (Tabela 3).

O processo de resfriamento altera a fluidez da bicamada fosfolipídica, fazendo com que os fosfolípeos semelhantes agrupem-se e excluam proteínas da membrana, diminuindo sua mobilidade e, assim, a funcionalidade da membrana (Jasko, 1994). A adição de insulina não melhorou essa perda na funcionalidade de membrana nem a integridade acrossomal, provavelmente em decorrência de sua ação no metabolismo espermático, mas não evidenciado efeito crioprotetor desse hormônio.

A capacitação é caracterizada por um padrão de movimento pela maioria dos espermatozoides no ato da fertilização e esses espermatozoides hiperativos tendem a movimentar-se vigorosamente em círculos (Ho & Suarez, 2001). Aquila et al. (2005) sugeriram um possível envolvimento de insulina na indução da capacitação de espermatozoides

humanos. Entretanto, neste experimento os valores de velocidade curvilínea foram inferiores a  $180 \mu\text{m/s}$  e a amplitude lateral de cabeça foi menor que  $12,0 \mu\text{m}$  para todas as concentrações de insulina utilizadas, valores compatíveis com espermatozoides não-capacitados (Rathi et al., 2001). Além disso, a integridade acrossomal também não foi afetada pela adição de insulina (Tabela 3).

A concentração de glicose no meio é o principal fator de liberação de insulina. A glicose aumenta a quantidade de ATP pela cadeia respiratória nas células  $\beta$  das ilhotas pancreáticas e os níveis de ATP controlam o fechamento dos canais de  $\text{K}^+$  e a despolarização da membrana plasmática. A despolarização faz com que os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  se abram e esse íon flua para dentro da célula provocando a liberação de insulina já sintetizada (Jeffrey & Alan, 2000). Esse mecanismo é semelhante nos eventos que antecedem a fertilização, que envolvem a capacitação e a reação acrossômica, apesar de cerca de 90% da produção de ATP no espermatozoide maduro ser obtida por glicólise (Mukay & Okuno, 2004). O  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular é requerido tanto na capacitação espermática quanto na indução da reação acrossômica (Kaul et al., 1997) e o início da reação acrossômica depende de um aumento intracelular massivo dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  na célula espermática (Bailey & Bayard, 1994).

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

Tabela 3 - Médias de membranas funcionais (hiposmótico) e acrossomas íntegros (PSA) no sêmen de garanhões Mangalarga Marchador imediatamente após o descongelamento

Insulina	%Hiposmótico	%PSA
0 UI/mL (controle)	30,1 ± 11,2a	68,2 ± 15,5a
0,1 UI/mL	31,4 ± 12,9a	71,7 ± 15,2a
1 UI/mL	30,9 ± 13,9a	71,6 ± 17,1a
10 UI/mL	32,2 ± 13,8a	73,3 ± 14,6a
Média geral	31,2	71,2

Médias seguidas pela mesma letra nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

é dose-dependente de glicose, assim como as células  $\beta$  do pâncreas. É possível que, na ausência de insulina no plasma seminal ou no diluente, o espermatozoide seja estimulado a liberar sua reserva de insulina para manter seu metabolismo. Esse processo acarreta a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  e ativa os mecanismos da reação acrossomal. Com a adição de insulina nos meios crioprotetores, os espermatozoides não necessitariam liberar suas reservas de insulina para captar a glicose do meio e não acarretariam a entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  nos mesmos nem a ativação dos mecanismos da reação acrossomal.

A capacitação tem sido correlacionada a alterações no metabolismo celular, na concentração intracelular de íons, na fluidez da membrana plasmática, no pH intracelular e na concentração intracelular de AMPc (Visconti et al., 1998). Entretanto, ainda não se sabe ao certo os mecanismos de ação da insulina no espermatozoide.

Mesmo não atuando diretamente na crioproteção, o fato de não ter influenciado na capacitação, a redução na amplitude lateral de cabeça e o aumento da frequência de batimento flagelar sugerem que a adição de insulina pode ser utilizada para atuação no metabolismo espermático e na manutenção da qualidade da amostra seminal de garanhões da raça Mangalarga Marchador. Entretanto, existe a necessidade de maiores estudos para determinar em qual mecanismo metabólico a insulina atua no espermatozoide e qual sua correlação com a fertilidade.

## Conclusões

A adição de 0,1 UI/mL e 1 UI/mL de insulina ao meio de congelamento de sêmen equino não teve efeito citotóxico às células espermáticas após o descongelamento.

## Referências

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

AITKEN, R.J. Pathophysiology of human spermatozoa. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v.6, p.128-135, 1994.

ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; BURATINI JUNIOR, J. The effect of breeds spermatic parameters over equine semen freezability. In: SYMPOSIUM OF STALLION SEMEN, 1996, Amersfoort. **Proceedings...** Amersfoort, 1996. p.82.

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

ARRUDA, R.P.; BALL, B.A.; GRAVANCE, C.G. et al. Evaluation of effects of extenders and cryoprotectants on equine spermatozoa using computer-assisted sperm analyses (CASA) and flow cytometry. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.31, p.228-229, 2003.

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 acrossome reaction: tyrphostin A48, pertussis toxin and 3-quinuclidinyl enzilate. **Molecular Reproduction and Development**, v.39, p.297-308, 1994.

BEDFORD S.J.; VARNER D.D.; MEYERS S.A. Effects of cryopreservation on the acrossomal status of stallion spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.56, p.133-140, 2000.

COLENBRANDER, B.; SIRIVAIDYAPONG, F.P.C.; CHENG, F.P. et al. Effect of sperm diluents on the acrossome reaction in canine sperm. **Theriogenology**, v.53, p.789-802, 2000.

CRUZ, C.D. **Programa GENES: estatística experimental e matrizes**. Viçosa, MG: Editora UFV, 2006. 285p.

CUNNINGHAM, D.V.M. **Tratado de fisiologia veterinária**, 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 528p.

DELL'AQUA JR., J.A.; PAPA, F.O.; ALVARENGA, M.A. et al. Effect of packing systems and thawing temperature on spermatic parameters and fertility rate of frozen equine semen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.25, p.458-460, 2001.

DUPONT, J.; KHAN, J.; QU, B.H. et al. 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.

GOMES, G.M.; JACOB, J.C.F.; MEDEIROS A.S.L. et al. Improvement of stallion spermatozoa with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. **Theriogenology**, v.58, p.277-279, 2002.

HICKS, J.J.; ROJAS, L.; ROSADO, A. Insulin regulation of spermatozoa metabolism. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF ENDOCRINOLOGY, 4., 1972, Washington, D.C. **Anais...** Washington, D.C., 1972. p.833-839.

JASKO, D.J. Procedures for cooling and freezing of equine semen. **ARS Veterinary**, 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.

HO, H.C.; SUAREZ, S.S. Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation. **Reproduction**, v.122, p.519-526, 2001.

KATHIRAVAN, P.; KALATHARAN, J.; EDWIN, M.J. et al. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.9-17, 2008.

KAUL, G.; SINGH, S.; GANDHI, K.K. et al. 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. et al. Insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-2 and -5 equine seminal plasma: Association with sperm characteristics and fertility. **Biology of Reproduction**, v.67, p.648-654, 2002.

MORTIMER, S.T. A critical review of the physiological importance and analysis of sperm movement in mammals. **Human Reproduction Update**, v.3, p.403-439, 1997.

MUKAI, C.; OKUNO, M. Glycolysis plays a major role for adenosine triphosphate supplementation in mouse sperm flagellar movement. **Biology of Reproduction**, v.71, p.540-547, 2004.

PICKETT, B.W.; AMANN, R.P. Cryopreservation of Semen. In: MCKINNON, A.O.; VOS, J.L. (Eds.) **Equine reproduction**. Philadelphia: Lea & Febiger, 1993. p.769-789.

RATHI, R.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M.M. et al. Evaluation of *in vitro* capacitation of stallion spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v.65, p.462-470, 2001.

- TRAVIS, A.J.; JORGEZ, C.J.; MERDIUSHEV, T. et al. Functional relationships between capacitation-dependent cell signaling and compartmentalized metabolic pathways in murine spermatozoa. **Journal Biology Chemical**, v.276, p.7630-7636, 2001.
- VAN 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.
- VIDAMENT, M.; DAIRE, C.; YVON, J.M. et al. Motility and fertility of stallion semen frozen with glycerol and/or dimethyl formamide. **Theriogenology**, v.58, p.249-251, 2002.
- VISCONTI, P.E.; GALANTINO-HOMER, H.; MOORE, G.D. et al. The molecular basis of sperm capacitation. **Journal of Andrology**, v.19, p.242-248, 1998.