

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS – FCAV  
CÂMPUS DE JABOTICABAL/SP**

**EFEITO DO TEMPO DE INTERAÇÃO ESPERMATOZOIDE-  
OÓCITO SOBRE A QUALIDADE EMBRIONÁRIA DE  
BOVINOS**

**Victória Marques**

Médica Veterinária



2026

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS – FCAV  
CÂMPUS DE JABOTICABAL/SP**

**EFEITO DO TEMPO DE INTERAÇÃO ESPERMATOZOIDE-  
OÓCITO SOBRE A QUALIDADE EMBRIONÁRIA DE  
BOVINOS**

**Discente: Victória Marques**

**Orientadora: Profa. Dra. Maíra Bianchi Rodrigues Alves**

**Coorientadora: Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes**

Dissertação de Mestrado apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV, Campus de Jaboticabal/SP, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias.

## FICHA CATALOGRÁFICA

M357e	<p>Marques, Victória</p> <p>Efeito do tempo de interação espermatozoide-oócito sobre a qualidade embrionária de bovinos / Victória Marques. -- Jaboticabal, 2026</p> <p>109 p. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal</p> <p>Orientadora: Maira Bianchi Rodrigues Alves</p> <p>Coorientadora: Lindsay Unno Gimenes</p> <p>1. Bovinos. 2. PIVE. 3. Espermatozoides. 4. Embrião. 5. Expressão Gênica.</p> <p>I. Título.</p>
-------	---

# CERTIFICADO DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: EFEITO DO TEMPO DE INTERAÇÃO ESPERMATOZOIDEÓCITO SOBRE A QUALIDADE EMBRIONÁRIA DE BOVINOS

AUTORA: VICTÓRIA MARQUES

ORIENTADORA: MAÍRA BIANCHI RODRIGUES ALVES  
ORIENTADORA: LINDSAY UNNO GIMENES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, área: Morfofisiologia e Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:



Prof.a.Dra. MAÍRA BIANCHI RODRIGUES ALVES (Participação Presencial)  
Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única / UNESP / Câmpus de Jaboticabal - FCAV



Prof. Dr. ANDRÉ FURUGEN CÉSAR DE ANDRADE (Participação Presencial)  
Departamento de Reprodução Animal / FMVZ USP Pirassununga/SP



Prof. Assistente Doutor ANTHONY CÉSAR DE SOUZA CASTILHO (Participação Virtual)  
Programa de Pós-graduação em Ciência Farmacológicas / IB UNESP Botucatu

Jaboticabal, 23 de fevereiro de 2026.

## **DADOS CURRICULARES**

**VICTORIA MARQUES** - nascida na cidade de São Paulo, estado de São Paulo, em 31 de agosto de 2001. Concluiu o ensino médio integrado ao curso técnico em Química pela Escola Técnica Estadual Getúlio Vargas, vinculada ao Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza (ETEC/CEETEPS).

Ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal/SP, em fevereiro de 2019, concluindo-o em fevereiro de 2024.

Em janeiro de 2024, iniciou o programa de pós-graduação stricto sensu em Ciências Veterinárias, em nível de mestrado, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FCAV/UNESP), Câmpus de Jaboticabal/SP, sob orientação da Profa. Dra. Maira Bianchi Rodrigues Alves e coorientação da Profa. Dra. Lindsay Unno Gimenes, com recebimento de bolsa concedida pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a todos que acreditaram em mim nesse processo. Em especial aos meus avós, Manuel e Lucinda Marques, e minha irmã, Giovanna Marques, por serem meu alicerce, meu refúgio e a maior expressão de amor e cuidado.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, Máira Bianchi Rodrigues Alves, pela dedicação, empenho e resiliência ao longo de toda a condução deste trabalho. Sua postura ética, rigor científico e compromisso com a excelência foram fundamentais para o meu crescimento acadêmico e profissional, transformando falhas em aprendizado e evolução contínua.

À minha coorientadora, Lindsay Unno Gimenes, agradeço pela oportunidade, pela confiança e por todo o apoio ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Sua contribuição foi essencial em todas as fases do processo, sempre com disponibilidade, incentivo e generosidade.

À banca examinadora, pelas valiosas contribuições, sugestões e considerações que enriqueceram significativamente este trabalho, agregando qualidade científica e fortalecendo a discussão dos resultados apresentados.

Ao Laboratório de Biotecnologias da Reprodução UNESP/FCAV, Câmpus de Jaboticabal (LABOR), pela infraestrutura, pelo ambiente de aprendizado e por possibilitar a realização deste estudo. Meu reconhecimento especial à equipe de suporte, Roberta e Sr. Edson, pelo auxílio técnico, dedicação e apoio constante durante a condução dos experimentos (e também pelas conversas e cafezinhos com pipoca que alegravam o nosso dia).

Agradeço, de forma especial, a todos os pós-graduandos (Marina, Laís e André), alunos de iniciação científica (Maria Julia, Lívia, Letícia e Ana Laura) e estagiários que, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, à Nelise Prosperute e ao Thalís Melo, meus companheiros de bancada, pela parceria diária, pelo apoio constante e por estarem presentes, compartilhando desafios, aprendizados e conquistas.

Aos meus pais, Ingrid e Norberto, agradeço profundamente por todo o apoio ao longo da minha formação acadêmica, por acreditarem na educação como base do futuro e por nunca medirem esforços para que eu pudesse seguir meus estudos com dignidade.

Aos meus avós, Manuel e Lucinda, minha eterna gratidão. Vocês foram meu verdadeiro conforto e meu maior apoio emocional durante esta etapa. São os anjos

da minha vida, presença constante de amor, acolhimento e força, fundamentais para que eu pudesse seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha irmã, Giovanna Marques, agradeço por ser a melhor irmã que eu poderia ter. Sua presença, amor incondicional e companheirismo tornaram essa caminhada mais leve e significativa.

Ao meu noivo, Pyetro Henrique Soares Colombo, agradeço por ter sido meu porto seguro ao longo desta trajetória. Obrigada pelo apoio emocional nos experimentos, inclusive nas madrugadas, pelo suporte nos momentos decisivos e por estar ao meu lado desde o início, compartilhando sonhos, desafios e conquistas.

Ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD- - USP/FZEA), agradeço pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho, bem como a toda a equipe envolvida. Em especial, ao professor Felipe Perecin e às pós-graduandas Ana Beatriz, Laura, Raíssa e Maria Alice, pelo auxílio fundamental na condução das análises moleculares e pela disponibilidade em compartilhar conhecimento.

Aos amigos que estiveram presentes durante essa caminhada, em especial à Isis e às meninas da República Bardosa, agradeço pela amizade e pelos momentos de apoio e descontração.

Ao Prof. Diogo e Dr. Arno do Laboratório de Genética em Aquicultura e Conservação do CAUNESP, agradeço pelo suporte na avaliação das imagens de microscopia, contribuição indispensável para a execução desta etapa do trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Programa de Incentivo e Estímulo à Pesquisa aos Recém-Contratados – IEPe-RC UNESP 2024 (144/2024), pela concessão de Auxílio à Pesquisa, que viabilizaram o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, e não menos importante, agradeço a Deus, presença essencial em toda a minha trajetória. Pela força, pela fé e pela sustentação em cada etapa desta caminhada. Sem ele nada disso seria possível.

## SUMÁRIO

1. Introdução geral.....	20
2. Hipótese.....	22
3. Objetivos.....	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	23
4. Capítulo 1 – Referencial teórico.....	24
Fecundação <i>in vitro</i> x <i>in vivo</i> : revisitando as bases fisiológicas.....	24
4.1. Introdução.....	24
4.2. Depósito e transporte de espermatozoides no trato reprodutivo feminino: a seleção e o tempo até chegada ao oviduto.....	25
4.3. Liberação dos espermatozoides do reservatório ovidutal, ovulação e capacitação espermática.....	28
4.4. A orquestra inicia-se pelo encontro de gametas na fecundação.....	30
4.5. Fusão de gametas e o bloqueio à polispermia.....	31
4.6. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	33
4.7. Tipo de sêmen.....	34
4.8. Seleção espermática <i>in vitro</i> .....	35
4.9. Capacitação <i>in vitro</i> : meios e ambiente.....	37
4.10. Tempo de interação entre gametas <i>in vitro</i> .....	38
4.11. Variações de protocolo na fecundação <i>in vitro</i> de curta duração em mamíferos não humanos.....	39
5. Capítulo 2* – “Menos é mais: um período curto de coincubação de gametas reduz as taxas de polispermia e melhora a qualidade do embrião em bovinos”.....	48
5.1. Introdução.....	48
5.2. Material e métodos.....	52
5.2.1. Declaração de Ética.....	52
5.2.2. Reagentes e condições de cultivo.....	53
5.2.3. Delineamento experimental.....	53
5.2.4. Avaliação das características morfofuncionais dos espermatozoides e do potencial de fértil <i>in vitro</i> .....	54
5.2.5. Produção de embriões <i>in vitro</i> (PIVE).....	55
5.2.6. Classificação do estágio de blastocisto.....	56
5.2.7. Avaliação do número de células do blastocisto.....	56
5.2.8. Avaliação das taxas de fecundação e polispermia.....	57

5.2.9. Avaliação da taxa de proliferação por imunofluorescência .....	58
5.2.10. Análise da expressão gênica por qPCR .....	58
5.2.11. Detecção de espécies reativas ao oxigênio nos zigotos.....	62
5.2.12. Análises estatísticas .....	63
5.3. Resultados .....	64
5.3.1. Os espermatozoides provenientes das partidas de sêmen criopreservados apresentaram qualidade morfofuncional e potencial fértil adequados. ....	64
5.3.2. A interação mínima de 8 horas entre o espermatozoide e o oócito é necessária para taxas adequadas de desenvolvimento embrionário e qualidade do blastocisto formado. ....	67
5.3.3. A FIV de curta duração mantém a cinética do desenvolvimento embrionário em comparação com a FIV controle. ....	72
5.3.4. O período de FIV de 8 horas reduziu a polispermia e a produção de EROs no zigotos enquanto a FIV de 16 horas diminuiu os níveis de antioxidante nos embriões de duas células. ....	74
5.3.5. A taxa de proliferação de embriões em clivagem não difere entre a FIV curta e a FIV controle.....	76
5.3.6. O número de células em blastocistos produzidos com 8 horas de FIV é maior do que produzidos com 16 horas de FIV, bem como número de divisões celulares.....	79
5.4. Discussão.....	81
7. Considerações finais.....	85
8. Referências.....	87

## CERTIFICADO CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



### CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

#### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Interações espermatozóide-ócito: efeitos sobre o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* em bovinos**", protocolo nº 512/23, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maira Bianchi Rodrigues Alves, 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) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 15 de fevereiro de 2023.

Vigência do Projeto	01/03/2023 a 31/12/2025
Espécie / Linhagem	Bovinos
Nº de animais	303
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	300 fêmeas e 03 machos
Origem	Abatedouro (fêmeas) e Centrais comerciais de colheita e processamento de sêmen (machos)

Jaboticabal, 15 de fevereiro de 2023.

  
**Profª Drª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP - Brasil  
Tel. 16 3209-7100 - www.fcav.unesp.br

# CERTIFICADO CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho de pesquisa intitulado “**Interações espermatozoide-oócito: efeitos sobre o desenvolvimento embrionário inicial *in vitro* em bovinos**”, sob orientação da Profa. Dra. Maíra Bianchi Rodrigues Alves e Certificado CEUA protocolo nº 512/23, aprovado em reunião ordinária em 15 de fevereiro de 2023e com término previsto para 31/12/2025, teve aumento no número de doses de sêmen de machos: de 03 para 14”, com aprovação das alterações em reunião ordinária de 19 de novembro de 2025.

Jaboticabal, 19 de novembro de 2025.



Assinado de forma  
digital por HELENA  
CRISTINA DELGADO  
BRITO:10199881774  
Dados: 2025.11.24  
11:17:30 -03'00'

Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal - SP  
(16) 3209-7100 [www.fcav.unesp.br](http://www.fcav.unesp.br)

## LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Albumina sérica bovina)
cDNA	<i>Complementary DNA</i> (DNA complementar)
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
CT	<i>Cycle Threshold</i> (Limite de ciclo)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilendiamino tetra-acético)
EROs	Espécies Reativas ao Oxigênio
EPM	Erro Padrão da Média
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSH	<i>Follicle Stimulating Hormone</i> (Hormônio folículo estimulante)
GPx	<i>Glutathione Peroxidase</i> (Glutathiona peroxidase)
hCG	<i>(Human Chorionic Gonadotropin</i> (Hormônio coriônico humano)
LABOR	Laboratório de Biotecnologias da Reprodução
mRNA	RNA Mensageiro
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (solução tampão fosfato salina)
PFA	Paraformaldeído
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
RT – qPCR	<i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em cadeia da polimerase em tempo real)
SFB	Soro Fetal Bovino
SOD	Superóxido dismutase
SOF	<i>Synthetic Oviduct Fluid</i> (Fluido sintético de oviduto)
TCM199	<i>Tissue Culture Medium 199</i> (Meio de cultura 199)
TRF	Trato Reprodutivo da Fêmea

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Protocolos de fecundação <i>in vitro</i> de curta duração em mamíferos não humanos: tempos de coincubação, condições capacitantes e impactos na qualidade embrionária .....	42
TABELA 2 – Símbolo do gene, sequência e função dos primers utilizados para RT-qPCR em embriões de 2 células (28 hpi) e de 8 a 32 células (96 hpi) .....	61
TABELA 3 – Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros morfofuncionais dos espermatozoides e do potencial de fertilidade dos lotes de sêmen criopreservado utilizados no Experimento 1.....	65
TABELA 4 – Desempenho das partidas de cinco touros Nelore ( <i>Bos indicus</i> ) selecionadas para o Experimento 2 com base nos resultados do Experimento 1....	66
TABELA 5 – Média e erro padrão da média (EPM) das taxas de desenvolvimento embrionário de acordo com os tempos de interação de 2, 4, 6, 8, 10 e 16 horas no Experimento 1.....	68
TABELA 6 – Média e erro padrão da média (EPM) da classificação do estágio de blastocistos no dia 7 (168 hpi) de cultivo em resposta a diferentes tempos de interação entre gametas (4, 6, 8, 10 e 16 horas) no Experimento 1 .....	70
TABELA 7 – Média e erro padrão da média (EPM) das taxas de desenvolvimento embrionário obtidas nos protocolos Shrt/IVF (8 h) e Ctrl/IVF (16 h) do Experimento 2 .....	73
TABELA 8 – Intensidade de fluorescência mediana, mínima e máxima dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelulares em zigotos obtidos dos grupos Shrt/IVF-8 h, Shrt/IVF-16 h e Ctrl/IVF-16 h .....	75

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Mecanismos rápido e lento de bloqueio à polispermia após a fusão espermatozoide–oócito em mamíferos .....	32
FIGURA 2 – Média e erro padrão da média do número total de células em blastocistos de acordo com os tempos de interação de 4 h, 6 h, 8 h, 10 h e 16 h .....	71
FIGURA 3 – Avaliação das taxas de fecundação e polispermia de embriões advindos de FIV curta (8 h) e de FIV controle (16 h) no Experimento 2 .....	74
FIGURA 4 – Avaliação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em zigotos no Experimento 2 .....	75
FIGURA 5 – Expressão do gene SOD-2 em embriões de dois blastômeros (28 hpi) do grupo Short/IVF (8 h) e do grupo Ctrl/IVF (16 h) no Experimento 2 .....	76
FIGURA 6 – Imagens de imunomarcção de Ki-67 em embriões de Shrt/IVF (8 h) e Ctrl/IVF (16 h) no Experimento 2 .....	78
FIGURA 7 – Avaliação da taxa de proliferação em embriões clivados no Dia 4 (96 hpi) e em blastocistos no Dia 7 (168 hpi) dos grupos Shrt/IVF (8 h) e Ctrl/IVF (16 h) no Experimento 2 .....	79
FIGURA 8 – Avaliação do número de células e da divisão celular em blastocistos no Dia 7 (168 hpi) do protocolo Shrt/IVF (8 h) e do protocolo Ctrl/IVF (16 h) no Experimento 2 .....	80

## **EFEITO DO TEMPO DE INTERAÇÃO ESPERMATOZOIDE-OÓCITO SOBRE A QUALIDADE EMBRIONÁRIA DE BOVINOS**

### **RESUMO**

A produção de embriões *in vitro* resulta em embriões com menor competência de desenvolvimento em comparação com a produção de embriões *in vivo*. Particularmente em bovinos, na fecundação *in vitro* (FIV), os espermatozoides são coincubados com oócitos maturados por período de 16 a 20 horas, para maximizar as taxas de produção. Por outro lado, *in vivo*, estima-se que a fecundação ocorra em 1 a 2 horas após a ovulação. Tendo em vista que na FIV os espermatozoides são coincubados com oócitos presumivelmente maduros, o período padrão de coincubação possivelmente expõe os gametas e zigotos recém-formados às espécies reativas ao oxigênio (EROs), o que pode comprometer a qualidade embrionária. Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do tempo de FIV sobre as taxas de desenvolvimento embrionário, incidência de polispermia, produção de EROs e qualidade embrionária em bovinos. No Experimento 1, os períodos de FIV de 2, 4, 6, 8, 10 e 16 horas foram avaliados para determinar o tempo mínimo necessário (Shrt/IVF; do inglês, Shrt=*short*) para atingir as taxas máximas de desenvolvimento, avaliando a primeira clivagem em 28 hpi (horas pós-inseminação), a clivagem em 96 hpi e a formação de blastocisto em 168 hpi. O estágio de formação de blastocisto (inicial, típico, expandido e eclodido) e o número de células também foram avaliados. Após a determinação do Shrt/IVF, no Experimento 2, os embriões produzidos com Shrt/IVF foram comparados aos produzidos com FIV de 16 horas (Controle; Ctrl/IVF) em relação à incidência de polispermia; níveis de EROs dos zigotos; expressão de genes relacionadas ao estresse oxidativo, proliferação celular e fatores de transcrição; número de células e taxa de proliferação dos embriões. Para a detecção dos níveis de EROs, os zigotos foram avaliados em três momentos: (1) após 8 horas de FIV (Shrt/IVF-8h); (2) após 16 horas, sendo 8 horas de FIV e 8 horas em desenvolvimento (Shrt/IVF-16h); e (3) após 16 horas de FIV (Ctrl/IVF-16h). As análises estatísticas foram realizadas no RStudio 4.4.2., aplicando o teste qui-quadrado para variáveis categóricas, ANOVA seguido pelo teste de Tukey para variáveis contínuas e o teste de Kruskal-Wallis para os níveis de EROs, com

significância definida em  $P < 0,05$ . No Experimento 1, períodos de FIV inferiores a 6 h reduziram significativamente as taxas de primeira clivagem ( $P < 0,0001$ ), e períodos inferiores a 8 h reduziram as taxas de clivagem ( $P < 0,0001$ ); as taxas de blastocistos não foram alteradas por períodos de FIV superiores a 6 horas. Entretanto, em relação à classificação dos blastocistos, uma maior proporção ( $P = 0,008$ ) de blastocisto expandido foi observada em 6, 8 e 10 horas. Assim, um período de FIV de 8 horas foi estabelecido como Shrt/IVF. No Experimento 2, embora o grupo Shrt/IVF ( $53,33 \pm 4,54\%$ ) tivesse taxa de fecundação semelhante ( $P=0,15$ ) aos embriões do grupo Ctrl/IVF ( $62,99 \pm 4,28\%$ ), os embriões Shrt/IVF ( $9,16 \pm 2,63\%^b$ ) apresentaram menores ( $P=0,006$ ) taxas de polispermia do que Ctrl/IVF ( $22,05 \pm 3,68\%^a$ ). O número de células dos blastocistos de Shrt/IVF ( $131,53 \pm 5,17$ ) foi maior ( $P=0,0003$ ) em comparação aos blastocistos de Ctrl/IVF ( $104,14 \pm 5,27$ ), sem diferença na taxa de proliferação dos blastocistos (Shrt/IVF:  $21,95 \pm 4,25\%$  vs. Ctrl/IVF:  $24,85 \pm 4,42\%$ ). Os níveis de EROs foram menores nos zigotos de Shrt/IVF-8h e Shrt/IVF-16h, em comparação com os zigotos de Ctrl/IVF-16h ( $P=0,0017$ ). Além disso, observou-se uma tendência ( $P=0,07$ ) para níveis mais elevados de SOD-2 em embriões de 2 células advindos de Shrt/IVF. Em conclusão, a redução do período de FIV para 8 horas diminui a taxa de polispermia e a presença de EROs no zigoto, preservando as taxas de fecundação e de formação de blastocisto. Este estudo fornece informações valiosas para o aprimoramento da biotecnologia de produção de embriões *in vitro*.

Palavras-chave: Bovino; PIVE; espermatozoides; embrião; estresse oxidativo; expressão gênica.

# EFFECT OF SPERM–OOCYTE INTERACTION TIME ON EMBRYONIC QUALITY IN CATTLE

## ABSTRACT

*In vitro* embryo production results in reduced developmental competence compared to *in vivo* conditions. Particularly in bovine, for *in vitro* fertilization (IVF), sperm and oocytes are usually co-incubated for a period of 16 to 20 hours to maximize fertilization rates. Whereas, *in vivo*, fertilization generally occurs within 1-2 hours after ovulation. Given that in IVF sperm are co-incubated with presumably mature oocytes, the standard 16–20-hours co-incubation period may represent a prolonged exposure time. This may lead to increased exposure of gametes and zygotes to reactive oxygen species (ROS), potentially compromising embryo quality. Herein, we investigated the effect of a shortened IVF period on embryo development rates, polyspermy incidence, ROS production, and embryo quality in cattle. In Experiment 1, IVF periods of 2, 4, 6, 8, 10, and 16 h were evaluated to determine the minimal exposure duration required to reach maximum developmental rates, evaluating first cleavage on 28 hpi (hours post-insemination), cleavage on 96 hpi, blastocyst on 168 hpi, and embryo quality (blastocyst stage, and cell number). Following determination of the shortened IVF period (Shrt/IVF) to reach proper developmental rates in Experiment 1, shrt/IVF was compared to standard 16-hour IVF (Control; ctrl/IVF) in Experiment 2, regarding polyspermy incidence, blastocyst cell number, proliferation, ROS levels, and expression of genes. For ROS levels detection, zygotes were evaluated at three moments: (1) after 8 hours of IVF (Shrt/IVF-8h); (2) after 18 hours with 8 hours of IVF and 8 hours of developmental culture (Shrt/IVF-16h); and (3) after 18 hours of IVF (Ctrl/IVF-16h). Statistical analyses were performed on RStudio 4.4.2, applying the chi-square test for categorical variables, ANOVA followed by Tukey's test for continuous variables, and the Kruskal–Wallis test for ROS levels, with significance set at  $P < 0.05$ . In Experiment 1, IVF periods lower than 6 h significantly reduced first cleavage rates ( $P < 0.0001$ ), and periods lower than 8 h reduced cleavage rates ( $P < 0.0001$ ); blastocyst rates were not altered by IVF periods higher than 6 hours. However, regarding blastocysts, a higher ( $P = 0.008$ ) rate of expanded blastocyst stage was observed at 6, 8, and 10 hours. Thus, an IVF period of 8 h was established as Shrt/IVF. In Experiment 2, while embryos of Shrt/IVF group displayed similar ( $P = 0.15$ ) fertilization rate compared to embryos of Ctrl/IVF ( $53.33 \pm 4.54\%$  vs.  $62.99 \pm 4.28\%$ , respectively),

the polyspermy rates were lower ( $P=0.006$ ) for embryos of Shrt/IVF ( $9.16 \pm 2.63\%$ <sup>b</sup> vs.  $22.05 \pm 3.68\%$ <sup>a</sup>). Blastocysts derived from Shrt/IVF displayed a higher number of cell ( $P=0.0003$ ) compared to blastocysts from Ctrl/IVF ( $131.53 \pm 5.17^a$  vs.  $104.14 \pm 5.27^b$ ), with no difference in blastocysts' cell proliferation (Shrt/IVF:  $21.95 \pm 4.25\%$  vs. Ctrl/IVF:  $24.85 \pm 4.42\%$ ). ROS levels were lower in zygotes from Shrt/IVF-8h and Shrt/IVF-16h, compared to zygotes from Ctrl/IVF-16h ( $P=0.0017$ ). Furthermore, a tendency ( $P=0.07$ ) toward higher *SOD-2* gene expression in two-cell embryos from Shrt/IVF group was observed. In conclusion, reducing the IVF period to 8 hours decreases polyspermy rate and zygote ROS content, while preserving fertilization and blastocyst rates. This study provides valuable insights for improving *in vitro* embryo production biotechnology.

Keywords: Bovine; IVEP; sperm; embryo; oxidative stress; gene expression.

## 1. Introdução geral

O aumento da demanda por alimentos de origem animal impõe desafios aos sistemas agropecuários, exigindo ganhos em eficiência produtiva e reprodutiva (ALEXANDRATOS et al., 2012; FAO, 2021). Nesse cenário, a bovinocultura assume papel estratégico na produção de carne e leite (MOTTET et al., 2018), com o Brasil ocupando posição de destaque global tanto em rebanho quanto em produção (IBGE, 2025; ABIEC, 2025). A eficiência reprodutiva e o melhoramento genético são reconhecidos como pilares fundamentais da cadeia, impactando diretamente indicadores produtivos e ambientais (OJO et al., 2024; TERRY, 2020; HEGARTY & MCEWAN, 2010; ABREU et al., 2022; ABREU et al., 2023).

As biotecnologias da reprodução, como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF), a transferência de embriões (TE) e produção *in vitro* de embriões (PIVE), têm sido amplamente empregadas como ferramentas estratégicas para a multiplicação de genótipos superiores, redução do intervalo entre gerações e aumento da previsibilidade reprodutiva (PASQUARIELLO et al., 2024; HENCHION, 2021; BIFARETTI et al., 2023). No Brasil, a ampla adoção dessas biotécnicas tem sido decisiva para o avanço dos programas de melhoramento genético e para a consolidação da PIVE como uma das principais ferramentas de multiplicação de animais de elevado valor zootécnico (MUELLER & VAN EENENNAAM, 2022). Dados da International Embryo Technology Society (IETS) indicam o país como um dos maiores produtores de embriões bovinos, sendo que cerca de 80% dos embriões transferidos mundialmente são oriundos de produção *in vitro*, refletindo a predominância dessa tecnologia e sua crescente importância em sistemas comerciais (VIANA, 2024).

Apesar de sua ampla aplicação, a PIVE apresenta variações expressivas na eficiência e na qualidade embrionária, frequentemente atribuídas às divergências entre as condições laboratoriais e o ambiente fisiológico da fecundação e do desenvolvimento inicial *in vivo* (RIZOS et al., 2002; LONERGAN & FAIR, 2008; KRISHER, 2024). A fecundação *in vivo* ocorre em um microambiente altamente especializado do trato reprodutivo feminino (TRF), no qual processos de seleção espermática, modulação da capacitação, equilíbrio redox e regulação das interações gaméticas são finamente orquestrados pelo epitélio e pelo fluido ovidutal (HOLT &

FAZELI, 2016). Nesse ambiente, a interação entre espermatozoide e oócito é altamente controlada, sendo modulada pela formação de reservatórios espermáticos e pela liberação gradativa de espermatozoides competentes após a ovulação. Em contraste, *in vitro*, os gametas são expostos a condições artificiais que, embora desenvolvidas para mimetizar o ambiente fisiológico, não reproduzem integralmente sua complexidade bioquímica e molecular. Além disso, os protocolos convencionais de FIV em bovinos geralmente adotam períodos prolongados de coincubação gamética, frequentemente entre 16 e 20 horas, sem o controle fisiológico exercido pelo oviduto (NAZARI, 2022). Embora seja reconhecido que os principais eventos da fecundação ocorrem nas primeiras horas de interação entre gametas, a duração da coincubação *in vitro* permanece pouco padronizada. A aplicação desses protocolos não reproduz integralmente os mecanismos fisiológicos que regulam a fecundação, sendo frequentemente influenciada por aspectos operacionais e rotinas laboratoriais. Essa exposição prolongada pode favorecer desequilíbrios redox, alterações na dinâmica de capacitação espermática e interações gaméticas desreguladas, com repercussões negativas sobre a competência, a morfologia embrionária (PLOURDE et al., 2012; KEANE & EALY, 2024) e a modulação epigenética (CORCORAN et al., 2006; SIRARD, 2017).

Na PIVE, embora as etapas iniciais de maturação e fecundação apresentem taxas elevadas de sucesso, sua eficiência declina nas fases subsequentes de desenvolvimento embrionário. Sob condições otimizadas de maturação *in vitro*, cerca de 85% a 90% dos oócitos atingem a metáfase II (MII) (HYTTEL et al., 1997), enquanto as taxas de fecundação, avaliadas pela clivagem até 48 horas, variam entre 70% e 85% (FERRÉ et al., 2020). No entanto, apenas cerca de 20% a 40% dos presumíveis zigotos alcançam o estágio de blastocisto após 6 a 7 dias de cultivo (LONERGAN et al., 2001), evidenciando uma queda acentuada na eficiência entre os eventos iniciais de fecundação e o desenvolvimento embrionário subsequente. Esses dados indicam que eventos relacionados à fecundação e, especialmente, ao período de interação inicial entre os gametas representam pontos críticos de vulnerabilidade do sistema *in vitro*.

Diante desse cenário, torna-se evidente que, embora a PIVE represente ferramenta essencial para a intensificação da bovinocultura e para a aceleração do

ganho genético, persistem lacunas importantes na compreensão dos mecanismos fisiológicos que regulam a fecundação em condições *in vitro*. Em particular, a ausência de controle temporal da interação espermatozoide–oócito, característica dos sistemas convencionais de FIV, levanta questionamentos quanto à adequação dos períodos de coincubação atualmente empregados. Nesse contexto, o tempo de interação gamética emerge como um fator crítico, com potencial impacto sobre o equilíbrio redox, a eventos iniciais pós-fecundação, conseqüentemente, sobre a qualidade embrionária.

Assim, o Capítulo 1 desta dissertação aborda os fundamentos fisiológicos da fecundação, com ênfase nas diferenças entre os ambientes *in vivo* e *in vitro*. O Capítulo 2 investiga experimentalmente o efeito do controle do tempo de interação espermatozoide-oócito sobre a fecundação e a qualidade embrionária, contribuindo para o refinamento dos protocolos de PIVE.

## **2. Hipótese**

Considerando que eventos fundamentais da fecundação ocorrem nas primeiras horas após o início da coincubação *in vitro* de espermatozoides com oócitos, períodos convencionais de coincubação dos gametas potencialmente ultrapassam a janela fisiológica necessária para a fecundação ocorrer de forma adequada decorrendo em prejuízos ao desenvolvimento do zigoto pré-formado. Assim, a hipótese deste estudo consiste em afirmar que a redução controlada do tempo de interação entre espermatozoide-oócito resulta em taxas adequadas de fecundação e desenvolvimento embrionário, ao mesmo tempo que preserva o equilíbrio redox, diminui a ocorrência de polispermia e melhora a qualidade embrionária pré-implantacional em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

## **3. Objetivos**

### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito do tempo de interação espermatozoide-oócito sobre a eficiência da fecundação e a qualidade embrionária inicial de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

### **3.2. Objetivos Específicos**

Os objetivos específicos são:

- 1) Comparar diferentes tempos de interação espermatozoide-oócito quanto à cinética de desenvolvimento embrionário em sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos;
- 2) Avaliar o impacto da duração da coincubação gamética sobre a qualidade embrionária, considerando parâmetros quantitativos e morfológicos;
- 3) Investigar como a diminuição do tempo de interação entre gametas influencia a ocorrência de eventos associados à modulação da competência embrionária (polispermia, níveis de espécies reativas ao oxigênio e níveis de transcritos associados ao estresse oxidativo);
- 4) Investigar como a diminuição do tempo de interação entre gametas influencia a qualidade dos embriões por meio da contagem de células e taxa de proliferação.

## 4. Capítulo 1 – Referencial teórico

### Fecundação *in vitro* x *in vivo*: revisitando as bases fisiológicas

#### 4.1. Introdução

A fecundação em mamíferos constitui um evento altamente especializado e rigidamente controlado, no qual a interação entre espermatozoide e oócito desencadeia uma cascata de processos celulares e moleculares essenciais para o estabelecimento do desenvolvimento embrionário inicial. Esse processo envolve a capacitação espermática gradativa, o reconhecimento da zona pelúcida, a reação acrossomal (RA), a fusão das membranas plasmáticas, a ativação oocitária e a formação dos pronúcleos masculino e feminino (YANAGIMACHI, 1994; HOLT & FAZELI, 2016). Em condições fisiológicas, tais eventos ocorrem predominantemente no oviduto, um ambiente altamente regulado que exerce papel ativo na seleção espermática, na modulação do estado funcional dos gametas e na prevenção da fecundação polispérmica (SUAREZ, 2008; COY et al., 2012; CORTAR et al., 2026).

A necessidade de reproduzir esse evento central fora do ambiente fisiológico impulsionou o desenvolvimento da FIV, que se consolidou como etapa fundamental da produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bovinos. Embora os sistemas de FIV tenham evoluído significativamente desde seus primeiros relatos, este baseia-se em uma simplificação do processo natural, na qual gametas são co-incubados em meio artificial, sob condições controladas de temperatura, pH e concentração gasosa (SIRARD et al., 2006; KRISHER, 2013). No entanto, mesmo com protocolos refinados, a FIV permanece incapaz de mimetizar plenamente a complexidade bioquímica, celular e temporal do ambiente ovidutal *in vivo* (LONERGAN & FAIR, 2016).

Na reprodução humana, a definição da janela temporal ideal para a FIV convencional tem sido amplamente investigada e progressivamente consolidada. Desde os primeiros estudos demonstrando que períodos reduzidos de co-incubação gamética eram suficientes para garantir taxas adequadas de penetração espermática (Sanchez & Schill, 1991), evidências subsequentes têm indicado que a FIV de curta duração não apenas preserva a eficiência da fecundação, como pode melhorar parâmetros embrionários e desfechos clínicos quando comparada à co-incubação

prolongada (Zhang et al., 2013; Huang et al., 2013; Fan et al., 2023; Nemerovsky et al., 2024). Esses benefícios têm sido atribuídos principalmente à redução da exposição dos gametas a subprodutos tóxicos associados aos espermatozoides, como EROs e produtos da peroxidação lipídica, os quais podem comprometer a integridade do DNA espermático, acelerar a reação acrossomal e prejudicar a sincronia dos eventos iniciais da fecundação. Como resultado, protocolos de FIV de curta duração têm sido progressivamente incorporados à prática clínica, ainda que com variações metodológicas.

Em contraste, na reprodução animal, a duração da interação na FIV permanece pouco padronizada. Embora seja reconhecido que os principais eventos da fecundação são desencadeados logo após o contato entre os gametas, ainda há um descompasso entre o conhecimento derivado da fisiologia da fecundação *in vivo* e a forma como esse processo é operacionalizado em condições laboratoriais, que frequentemente simplificam ou estendem artificialmente o período. Além disso, a literatura em reprodução animal ainda carece de abordagens integrativas que considerem a dimensão temporal da fecundação à luz das particularidades, o que tem contribuído para a adoção de protocolos heterogêneos entre laboratórios e espécies. Nesse contexto, torna-se relevante revisitar criticamente os fundamentos fisiológicos da fecundação e discutir como sua cronologia pode informar estratégias mais racionais para a FIV em espécies de interesse zootécnico. Dessa forma, essa revisão de literatura abordará os aspectos que envolvem a fecundação *in vivo*, de forma a comparar com os eventos que ocorrem na fecundação *in vitro*.

#### **4.2. Depósito e transporte de espermatozoides no trato reprodutivo feminino: a seleção e o tempo até chegada ao oviduto**

O local de deposição do sêmen no TRF pode variar de acordo com a espécie, sendo na vagina, em caso de ruminantes, primatas e murinos, ou no útero, como nos suínos e equinos (Harper & Austin & Short, 1982). Após depositados no TRF, os espermatozoides iniciam percurso onde fatores físicos e bioquímicos atuam em série (SUAREZ & PACEY, 2005). Em mamíferos, estima-se que dos milhares de espermatozoides depositados no TRF apenas 0,001% a 0,1% chegam à ampola, próximo ao local da fecundação (MITCHELL, 1985). Nas espécies de deposição vaginal, o início da seleção ocorre no canal cervical com a passagem pelo muco cervical, um fluido viscoelástico que dificulta a progressão de espermatozoides com

motilidade lenta e morfologicamente anormais (EAMER, 2015), levando alguns minutos para alcançar o corpo do útero (SOBRERO & MACLEOD, 1962). No útero, mecanismos adicionais de seleção entram em ação: o ambiente uterino apresenta padrões de fluxo e gradientes bioquímicos que favorecem o deslocamento de subpopulações espermáticas mais rápidas e resistentes, ao mesmo tempo em que promove a remoção de células incapazes por fagocitose mediada por neutrófilos e por fluxo retrógrado (SUAREZ, 2002; HUNTER, 2012).

À medida que avançam em direção à junção útero-tubárica (JUT), os espermatozoides encontram a barreira mais seletiva de todo o trajeto pelo TRF, definida por ser um estreitamento anatômico acentuado e por ter um epitélio altamente especializado (SUAREZ & PACEY, 2005; LARSSON et al., 2019). A JUT permite que apenas uma fração mínima dos espermatozoides tenha acesso ao oviduto. Em bovinos, estima-se que de 100 a 1.000 espermatozoides atravessem essa região (HUNTER, 1981); em suínos, apesar da ejaculação conter bilhões de células, estima-se que entre 100.000 e 1.000.000 podem alcançar o oviduto (HUNTER & RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2004). Essa filtragem exerce papel essencial na seleção de espermatozoides com menor dano ao DNA e maior competência funcional, favorecendo apenas aqueles capazes de manter motilidade progressiva, integridade estrutural e responsividade aos sinais do microambiente ovidutal (CAMARA PIREZ et al., 2020).

Além da seleção espermática que ocorre ao longo do trajeto pelo TRF, os espermatozoides não atingem o oviduto instantaneamente. Embora exista um tempo necessário para que essas células atinjam a JUT, o transporte de subpopulações de espermatozoides móveis até oviduto varia entre as espécies. Em bovinos, células espermáticas podem alcançar a JUT em 15 a 30 minutos após a deposição do sêmen no TRF (HUNTER, 2012). Nos suínos, o transporte é intensificado pelas contrações útero-cervicais pós-cópula, possibilitando chegada ao oviduto em 15 a 20 minutos, enquanto o contingente principal chega em 2 a 3 horas (HUNTER, 1981). Em equinos, a chegada ao oviduto ocorre tipicamente entre 1 e 2 horas pós-cobertura (FIALLA et al. 2008). Em humanos, pequenas subpopulações rápidas podem alcançar o istmo em 5 a 15 minutos, embora a maioria seja detectada entre 1 a 3 horas (HARPER, 1994). Em murinos, a entrada no oviduto ocorre entre 10 e 20 minutos após a cópula

(SUAREZ, 2008). Dessa forma, os primeiros espermatozoides atingem o oviduto, de forma geral, em cerca de 15 minutos a 2 horas após a deposição do sêmen no TRF.

Ao adentrarem o oviduto, os espermatozoides formam o reservatório espermático (CORTAT et al., 2026) na porção inicial do istmo, onde permanecem ligados ao epitélio por interações específicas entre glicoconjugados ovidutais e receptores espermáticos (LEFEBVRE & SUAREZ, 1996). Proteínas do plasma seminal que interagem com a mucosa ovidutal, como as *binder of sperm proteins* (BSPs), promovem adesão e formação desse reservatório, prolongando a janela de fecundação de maneira regulada em bovinos (GWATHMEY et al., 2003). Os componentes do epitélio ovidutal, incluindo proteínas como OVGP1 e vesículas extracelulares, atuam modulando diretamente a superfície espermática e retardando a capacitação prematuras, preservando a viabilidade até a liberação coordenada pós-ovulatória (LAMI et al., 2018). Estudos em bovinos (GUALTIERI & TALEVI, 2000), humanos (ELLINGTON et al., 1999) e equinos (GIMENO et al., 2021) demonstraram que apenas espermatozoides viáveis, não capacitados (LEEMANS et al., 2014), e com acrossomo intacto se ligam às células ovidutais. Dessa forma, os espermatozoides selecionados que atingem o oviduto em cerca de 15 minutos a 2 horas potencialmente são os espermatozoides com maior potencial de fecundar o oócito e permanecerão interagindo com o oviduto até o momento da fecundação.

Os espermatozoides permanecem conectados às células ovidutais do istmo até que ocorra sinal para a liberação destes promovido pela ovulação. O tempo de viabilidade dos espermatozoides no “reservatório funcional” ovidutal representa fator chave para ampliação da janela de fecundação e aplicações de biotécnicas reprodutivas visto que permite que a deposição do sêmen ocorra antes da ovulação. Em bovinos, espermatozoides podem permanecer viáveis no reservatório ovidutal por 24 a 30 horas (MAHÉ et al., 2021); em suínos, períodos ainda mais longos são descritos, de 36 a 72 horas, compatíveis com o padrão prolongado de estro (Hunter, 1982). Em equinos, a permanência é tipicamente mais curta, entre 12 a 24 horas, enquanto em humanos o reservatório permanece pouco elucidado, mas há relatos de que a sobrevivência funcional espermática no TRF possa atingir 48 a 72 horas (SUAREZ & PACEY, 2005; HOLT & FAZELI, 2010). Em murinos, a ligação ao istmo pode persistir por 12 a 24 horas (SUAREZ, 2008). No entanto, dependendo da qualidade de sêmen depositado e das técnicas de processamento esse tempo de

sobrevivência no reservatório ovidutal pode ser alterado. Neste sentido, Carvalho et al. (2018) descreveram que espermatozoides bovinos criopreservados sexados apresentam a mesma capacidade de permanecer por mais de 24 horas ligados às células ovidutais, porém com menor quantidade de espermatozoides ligados por mm<sup>2</sup> de explantes de oviduto. De qualquer forma, o oviduto atua como reservatório importante para os espermatozoides aguardarem a ovulação e chegada do oócito.

#### **4.3. Liberação dos espermatozoides do reservatório ovidutal, ovulação e capacitação espermática**

Durante o período peri-ovulatório, uma série de mudanças específicas no ambiente ovidutal desencadeia a liberação progressiva dos espermatozoides ligada ao epitélio do istmo, permitindo que apenas células já parcialmente preparadas avancem rumo à ampola para a fecundação (COY et al., 2016). Essa liberação é regulada por um conjunto de sinais hormonais, mecânicos e moleculares que alteram a dinâmica epitelial e fluidos locais (BERGQVIST et al., 2006a). O aumento acentuado de estrogênio no período pré-ovulatório (RAGO et al., 2006), seguido pela elevação transitória de progesterona no momento da ovulação (YAMASHITA et al., 2003), modifica a consistência do fluido ovidutal, a expressão de glicoproteínas secretadas e a atividade de canais iônicos epiteliais que modulam o microambiente luminal (BRENKER et al., 2018). Além disso, há um aumento acentuado de glicosaminoglicanos sulfatados (GAGs), semelhantes à heparina, que facilitam o desprendimento seletivo de células já parcialmente capacitadas (BERGQVIST et al., 2006). Dessa forma, os espermatozoides são liberados do reservatório ovidutal com estímulos vindos da ovulação.

Além dos estímulos hormonais e bioquímicos associados à ovulação, a dissociação espermatozoide-epitélio depende de modificações moleculares progressivas na superfície espermática. Especificamente, a liberação requer a perda ou remodelação de proteínas de ligação adquiridas no plasma seminal, que são responsáveis pela adesão inicial ao epitélio ovidutal. Em bovinos, destacam-se as proteínas BSP (*Binder of SPerm proteins*) (GWATHMEY et al., 2006), enquanto em suínos são descritas as proteínas AQN e AWN (EKHLASI-HUNDRIESER et al., 2005), e em primatas, moléculas como DEFB126 e lactoferrina (TOLLNER et al., 2008).

À medida que o fluido ovidutal peri-ovulatório se torna mais rico em albumina, fosfolipases e glicosidases, essas proteínas de ligação são gradualmente removidas ou modificadas na membrana espermática. Esse processo reduz a afinidade dos espermatozoides por glicoconjugados do epitélio do istmo, como anexinas, HSPA5, HSPA8 e E-caderina (IGNOTZ et al., 2007), favorecendo sua liberação. Concomitantemente, essas alterações bioquímicas atuam como sinais indutores da capacitação espermática, preparando os espermatozoides para a hiperativação, reação acrossômica e interação eficiente com o oócito (LEEMANS et al., 2019). Embora a capacitação espermática possa iniciar de maneira branda durante a passagem pelo útero, as mudanças mais significativas relacionadas à hiperativação e RA ocorrem após a liberação do reservatório espermático. Componentes abundantes do fluido ovidutal peri-ovulatório, como a albumina, o bicarbonato e o cálcio (GANGWAR et al., 2015) promovem efluxo de colesterol e remodelamento da membrana plasmática, ativam a adenilato ciclase espermática (sAC), elevando os níveis de cAMP e ativando a proteína quinase A (PKA) no espermatozoide (SIGNORELLI et al., 2012). Esses desencadeiam uma cascata de fosforilações que reorganizam os domínios lipídicos, aumentam a fluidez da membrana e preparam o espermatozoide para a fusão com o oócito.

Com o avanço das mudanças relacionadas à capacitação, o espermatozoide torna-se responsivo às moléculas liberadas pelas células da granulosa e oócito, principalmente à progesterona (SCHUETZ et al., 1981). Tais modulações atuam sobre canais iônicos específicos como CatSper (ROMERO-AGUIRREGOMEZ et al. 2019), regulando a entrada de cálcio e promovendo a transição para o estado de hiperativação do espermatozoide (STRÜNKER et al., 2011). A hiperativação promove uma grande propulsão do espermatozoide nas substâncias viscoelásticas no oviduto (CHANG & SUAREZ, 2010) permitindo que ultrapasse a barreira de células do *cumulus* para a fecundação (ARMON & EISENBACH, 2011). Além de permitir alcançar a zona pelúcida oocitária, essas modulações condicionam os espermatozoides para a ocorrência da RA e para a fecundação do oócito (GRIPPO et al., 1995). A RA consiste em uma reação complexa e irreversível, onde o conteúdo do acrossoma, vesícula secretora originária do aparelho de Golgi localizada na porção posterior da cabeça, sofre exocitose durante o estágio inicial da interação entre gametas (SIMONS & FAUCI, 2018). Há evidências recentes que demonstram que a

maioria dos espermatozoides murinos inicia a reação de forma leve no istmo, antes de atingir a ampola (HINO et al., 2016). No entanto, caso essa ocorra por completo de forma não orquestrada com o encontro espermatozoide-oócito, impedirá que o espermatozoide atravesse as células do *cumulus* e zona pelúcida, o que resulta na perda do potencial fecundante (FLORMAN et al., 2008).

#### **4.4. A orquestra inicia-se pelo encontro de gametas na fecundação**

Após a ovulação, há liberação dos espermatozoides do reservatório ovidutal, e os espermatozoides passam por mudanças relacionadas à capacitação e seguem em direção à ampola do oviduto. Eventos relacionados com a capacitação espermática, como fosforilação da tirosina, hiperativação e RA, ocorrem cerca de uma hora após a ovulação (NAZ et al., 2004). Em consonância, a chegada do oócito na ampola também relatada uma hora após a ovulação (COY et al., 2012). Neste segmento, já em contato com o oócito, o espermatozoide previamente hiperativado enfrenta a primeira barreira constituída pelo complexo *cumulus-oophorus*, cuja matriz rica em ácido hialurônico impõe tanto um desafio mecânico quanto uma necessidade de ação enzimática coordenada (YANAGIMACHI, 1994). A progesterona secretada pelas células do *cumulus* atua como um sinal quimiotático, estimulando diretamente canais CatSper na membrana espermática e promovendo um influxo acentuado de  $Ca^{2+}$  que incrementa a amplitude do batimento flagelar e estabelece o padrão de hiperativação necessário para vencer a viscosidade (SCHIFFER et al., 2020). Concomitantemente, a exposição a esses sinais promove a exocitose de enzimas presentes no acrossoma durante a RA, como hialuronidases (PH-20/SPAM1 e isoformas HYAL), que degradam os polímeros de hialurônico e permitem que o espermatozoide avance e entre em contato com a zona pelúcida (SEOL et al., 2022). Ao penetrar o *cumulus*, a membrana interna do acrossoma controla a liberação de proteases, como a acrosina e outras serina-proteases, de modo a coordenar digestão localizada da matriz e exposição de proteínas de adesão à zona (FERRER et al., 2012)

Quando o gameta estabelece contato com a zona pelúcida (ZP), instala-se uma etapa de reconhecimento molecular altamente específica. As glicoproteínas da ZP, os glicoconjugados de ZP3 e ZP4 interagem com proteínas espermáticas de ligação (ZPBP, ZP3R e outras), e essa ligação funcional desencadeia sinais que amplificam o influxo de  $Ca^{2+}$  e promovem pulsos adicionais de hiperativação direcionada que

favorecem a perfuração focal da zona pelúcida (JIN et al., 2011). Atravessar a ZP implica, portanto, uma combinação de degradação enzimática local e trabalho mecânico do flagelo, produzindo um processo que, em bovinos e em outras espécies mamíferas, tipicamente ocorre em 5 a 20 minutos, variando conforme a composição e organização da matriz glicoproteica e o estado fisiológico do espermatozoide (COY et al., 2008; HIROHASHI & YANAGIMACHI, 2018).

#### **4.5. Fusão de gametas e o bloqueio à polispermia**

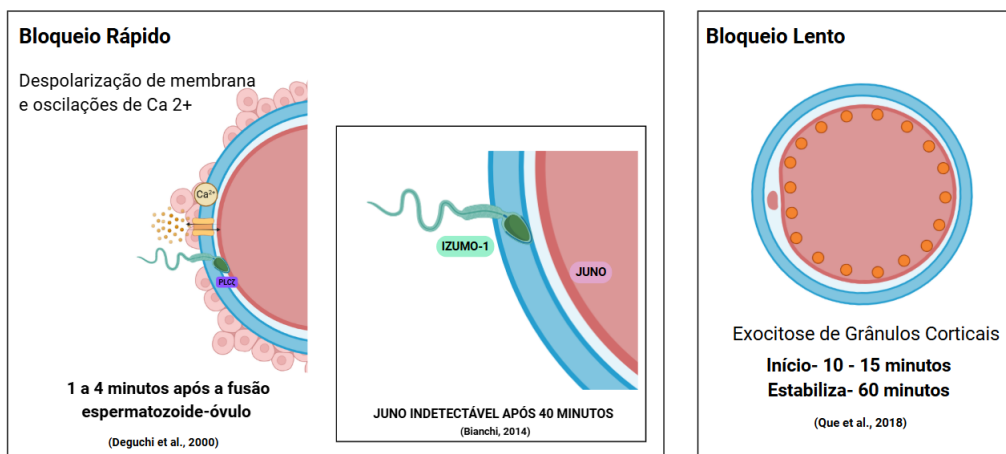
Ao atravessar a zona pelúcida após acentuada atividade proteolítica, o espermatozoide acessa o espaço perivitelínico sendo necessário que conserve a integridade estrutural. Simultaneamente, o oócito responde com reorganizações locais do citoesqueleto cortical e por manutenção de microambientes lipídicos que favorecem o acoplamento da membrana que filtram ainda mais a população espermática até restar aquele único candidato à fusão (COY et al., 2008; JIN et al., 2011). Durante a fusão gamética, uma molécula-chave entregue pelo espermatozoide, a fosfolipase C zeta (PLC $\zeta$ ), desencadeia a ativação oocitária ao iniciar uma cascata sinalizadora intracelular. A PLC $\zeta$  catalisa a produção de inositol 1,4,5-trifosfato (IP $_3$ ), que promove a liberação de Ca $^{2+}$  do retículo endoplasmático, resultando em oscilações de cálcio essenciais para a retomada da meiose II e para o início dos mecanismos de bloqueio à polispermia (SWANN et al., 2006; NOMIKOS et al., 2017). Em mamíferos, essas oscilações de Ca $^{2+}$  ocorrem de forma repetitiva, ao longo de minutos a horas, diferindo do pico único descrito em espécies não mamíferas, como anfíbios, e variando conforme a espécie e a quantidade de PLC $\zeta$  entregue pelo espermatozoide (JAFFE & GOULD, 1985; CUTHBERTSON & COBBOLD, 1985), ocorrendo de 1 a 4 minutos após a entrada do espermatozoide (DEGUCHI et al. 2000).

A etapa final pré-fusional envolve o pareamento molecular entre a proteína espermática IZUMO1, cuja exposição depende da reação acrossomal, e o receptor oocitário JUNO, ancorado à membrana por glicofosfatidilinositol (GPI) (COONROD et al, 1999). Essa interação induz à reorganização da membrana oocitária em microdomínios ricos em tetraspaninas, como CD9, e lipídios essenciais, promovendo alterações locais de curvatura e fluidez que precedem a hemifusão e a fusão completa das membranas gaméticas (SUTOVSKY, 2014). JUNO é altamente expresso em oócitos não fecundados e sofre rápida perda após a fecundação, nos primeiros 30 a

40 minutos, eliminando sítios de reconhecimento para IZUMO1 e complementando assim as barreiras enzimáticas e elétricas já em vigor (BIANCHI et al., 2014). Com a fusão completa, observa-se uma alteração rápida do potencial de membrana do citoplasma oocitário (denominado “bloqueio rápido”; **Figura 1**) que surge no ápice da fusão e persiste por um período breve (da ordem de segundos a poucos minutos), reduzindo abruptamente a probabilidade de fusões adicionais durante a janela inicial pós-entrada (JAFFE, 2022).

O bloqueio lento à polispermia (**Figura 1**), por sua vez, é dependente das oscilações de  $Ca^{2+}$  e da exocitose dos grânulos corticais. Esse processo leva à liberação de enzimas específicas, como a metaloprotease ovastacina (ASTL), que cliva a glicoproteína ZP2 e promove o chamado endurecimento da zona pelúcida. Essa remodelação estrutural e irreversível da matriz da zona reduz a afinidade por ligantes espermáticos e impede novas penetrações (BURKART et al., 2012; GAHLAY et al., 2010). A migração e exocitose dos grânulos corticais podem ser detectadas entre 10 e 15 minutos após a fusão espermatozoide–oócito, com consolidação do bloqueio lento em até 60 minutos, dependendo da eficiência da resposta cálcica e de características espécie-específicas (QUE et al., 2018; VOGT et al., 2019). O resultado é uma zona pelúcida enzimaticamente remodelada e fisicamente menos permissiva, constituindo o principal mecanismo tardio de prevenção da polispermia, consolidando o bloqueio efetivo entre 10 a 60 minutos após a entrada do primeiro espermatozoide.

**Figura 1** – Imagem ilustrativa dos mecanismos rápido e lento de bloqueio à polispermia após a fusão espermatozoide–oócito em mamíferos. Autoria própria (2026).



Legenda: Esquema ilustrativo dos mecanismos de bloqueio à polispermia. O bloqueio rápido ocorre nos primeiros minutos (1 - 4 minutos), envolvendo despolarização da membrana e oscilações iniciais de  $Ca^{2+}$ , eventos desencadeados pela liberação da PLC $\zeta$  espermática. Em seguida, a interação IZUMO1 - JUNO é acompanhada pela rápida perda de JUNO da membrana do oócito, indetectável entre 30 - 40 minutos após a fecundação. O bloqueio lento, envolve a exocitose dos grânulos corticais, iniciada entre 10 e 15 minutos e estabilizada em torno de 60 minutos, resultando na remodelação enzimática da zona pelúcida e na prevenção definitiva da polispermia (Deguchi et al., 2000; Bianchi et al., 2014; Que et al., 2018).

#### **4.6. Fecundação *in vitro* (FIV)**

A FIV em mamíferos não humanos foi desenvolvida com o objetivo de reproduzir, em ambiente controlado, os eventos celulares e moleculares similares ao TRF durante a fecundação, permitindo a produção de embriões a partir da maturação, capacitação e interação gamética em condições laboratoriais (LONERGAN & FAIR, 2016). Nas espécies de interesse zootécnico, especialmente ruminantes e suínos, a FIV tornou-se uma ferramenta estratégica para elevar o potencial reprodutivo de doadoras de alto mérito, integrar-se a programas de seleção genética e maior aproveitamento de sêmen com elevado valor agregado, como por exemplo o sexado (MUELLER & EENENNAM, 2022).

Entretanto, apesar de sua ampla aplicabilidade, a FIV apresenta condições distintas das encontradas *in vivo*, sobretudo no que se refere à dinâmica de seleção espermática, ao microambiente redox, à composição iônica e metabólica dos fluidos, à tensão de oxigênio e ao controle temporal das interações gaméticas (VENTURA-JUNCÁ et al, 2015.). Como citado anteriormente, no TRF, a fecundação é precedida por uma série de barreiras fisiológicas que promovem seleção funcional rigorosa dos espermatozoides, regulam a capacitação de forma gradativa e sincronizam a chegada de gametas competentes à ampola ovidutal prevenindo eventos de polispermia (HOLT & FAZELI, 2016). Por outro lado, em condições laboratoriais esses mecanismos seletivos são em grande parte suprimidos, uma vez que altas concentrações espermáticas são colocadas em contato direto com o oócito em meios sintéticos, sob condições estáticas e com capacidade antioxidante limitada, favorecendo a geração de EROs, a peroxidação lipídica, a disfunção mitocondrial e o comprometimento da integridade do DNA espermático e oocitário (AITKEN & BAKER, 2006; GUERIN et al., 2001).

Além disso, a composição do meio de fecundação, a tensão de oxigênio utilizada (geralmente superior à fisiológica do TRF), o tipo e o estado funcional do sêmen (*in natura*, refrigerado ou criopreservado), e a ausência de secreções ovidutais moduladoras da capacitação e da reação acrossomal criam um cenário no qual a cinética de interação espermatozoide-oócito se torna artificialmente acelerada e pouco sincronizada (SWAIN et al, 2015; DALLE-PALLE et al, 2025).

#### **4.7. Tipo de sêmen**

A eficiência da FIV e a qualidade embrionária inicial são profundamente influenciadas pelo tipo de sêmen utilizado, uma vez que os diferentes métodos de coleta e conservação impõem graus distintos de estresse oxidativo, alterações de membrana, disfunção mitocondrial e desregulação da capacitação. Em bubalinos, comparações diretas aplicando o sêmen *in natura* no sistema *in vitro* resultaram em melhores taxas conversão de embriões clivados em blastocistos e maior taxa de sobrevivência à criopreservação (SOLIMAN et al., 2018). Em bovinos, o uso de sêmen refrigerado em relação ao sêmen congelado, preserva mais eficientemente a motilidade progressiva e a integridade das membranas espermáticas, refletindo-se em maiores taxas de desenvolvimento embrionário e melhor qualidade dos embriões produzidos (HU et al., 2025). De forma convergente, em bubalinos, o sêmen refrigerado apresentou melhores taxas de fecundação e de desenvolvimento em relação ao criopreservado (ALMEIDA et al., 2020). Em conjunto, esses achados reforçam que, em ruminantes, o estado funcional do sêmen exerce influência marcante sobre a competência embrionária, especialmente nas fases tardias do desenvolvimento *in vitro*.

Embora apresente melhores resultados, o uso de espermatozoides isolados de sêmen refrigerado, com sinais iniciais de capacitação e aumento de EROs, pode reduzir a longevidade funcional das células durante a coincubação com o oócito (PERIS-FRAU et al., 2020) e prejudicar o desenvolvimento embrionário. Por outro lado, o uso de espermatozoides obtidos de sêmen criopreservado que apresentam aumento significativo de EROs, redução do potencial de membrana mitocondrial e aumento da taxa de fragmentação de DNA, associados à capacitação acelerada e reação acrossomal espontânea, culmina em menores taxas de fecundação e desenvolvimento embrionário (FLEMING & THOMSON, 2025). Em suínos, espécie

notoriamente sensível à polispermia e ao estresse oxidativo em sistemas de FIV, o uso de espermatozoides obtidos de sêmen *in natura* resulta em maiores taxas de penetração monospermica e melhor desenvolvimento embrionário quando comparado ao uso de espermatozoides obtidos de sêmen refrigerado ou criopreservado, os quais exibem maior instabilidade de membrana, aumento de capacitação espontânea e elevação da fragmentação de DNA após a exposição *in vitro* (SAHA et al. 2014).

#### **4.8. Seleção espermática *in vitro***

A seleção espermática *in vitro* constitui uma etapa crítica da fecundação, pois rompe o ambiente fisiológico protetor conferido pelo plasma seminal, o qual contém um conjunto de antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase) e não enzimáticos (vitamina C, vitamina E, glutathione reduzida, taurina, hipotaurina), responsáveis por tamponar a produção basal de EROs e preservar a integridade de membrana, mitocôndrias e cromatina espermática (PAHUNE et al, 2013). A remoção do plasma durante os procedimentos de preparo expõe os espermatozoides a ambiente oxidativo instável, no qual as principais fontes de EROs passam a ser os próprios espermatozoides imaturos com retenção citoplasmática e os leucócitos residuais, reconhecidos como os maiores produtores de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio no ejaculado (SALLEN et al., 2002).

Entre os métodos clássicos de seleção utilizados em FIV de mamíferos não humanos, destacam-se o *swim-up* e a centrifugação em gradientes de densidade, baseados, respectivamente, na motilidade progressiva e na densidade celular. No *swim-up*, os espermatozoides móveis migram para um meio contendo bicarbonato e albumina, componentes que estimulam a capacitação por ativação da adenilato ciclase solúvel, aumento de cAMP e fosforilação de proteínas em tirosina (BALASURIYA et al. 2014; DELGADO-BERMÚDEZ et al., 2022). A centrifugação em gradiente de densidade, amplamente empregada em modelos bovinos, suínos e murinos utiliza fluidos coloidais de sílica revestidas por silano (Percoll, PureSperm, Isolate, SpermGrad), permitindo a recuperação de espermatozoides morfolologicamente normais e com maior potencial mitocondrial (KOPPERS et al. 2010). Durante o processo, os espermatozoides com membrana plasmática íntegra, acrossomo preservado e maior compactação de cromatina migram para as camadas inferiores do gradiente, enquanto células imaturas e morfolologicamente anormais

permanecem nas camadas superiores (MORTIMER, 2000), sendo retiradas. Além disso, células móveis tendem a ser mais eficientes para migrarem para as camadas inferiores do gradiente. Adicionalmente, a remoção do plasma seminal, leucócitos e detritos celulares reduz fontes exógenas de EROs (AITKEN et al., 1994; CASTELLINI et al., 2020), minimizando o estresse oxidativo induzido durante o processamento seminal.

Entretanto, forças de cisalhamento mecânico durante a centrifugação, compactação celular no pellet e possível contaminação por metais presentes nos meios de gradiente favorecem a produção local de EROs, especialmente hidroxilas, capazes de induzir oxidação de bases nitrogenadas e formação de 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) no DNA espermático (AITKEN et al., 1988.). Estudos com TUNEL e 8-OHdG demonstraram que, embora o DGC reduza a proporção global de células mortas e com cromatina severamente danificada, pode aumentar a fração de espermatozoides viáveis com lesões oxidativas subletais no DNA, particularmente em amostras de menor qualidade seminal (AITKEN et al., 2010).

Adicionalmente, a composição química dos meios de seleção exerce impacto direto sobre o estado redox e a cinética de capacitação. A presença de albumina sérica bovina (BSA) atua no efluxo de colesterol, promovendo remodelação da membrana e influxo de  $Ca^{2+}$ , mas também pode veicular metais de transição e catalisar reações tipo Fenton se não for adequadamente purificada, intensificando a produção de radicais hidroxila (CHAVES et al., 2021). Nessa reação, o peróxido de hidrogênio é convertido em radical hidroxila, uma espécie altamente reativa capaz de induzir peroxidação lipídica, oxidação proteica (GOUVEIA, 2012), levando a dano ao DNA espermático. Gradientes contendo agentes quelantes como EDTA demonstram reduzir significativamente a oxidação do DNA, confirmando que parte do dano induzido durante a seleção é mediado por metais redox-ativos presentes nos meios comerciais (MURATORI et al., 2019).

Técnicas mais recentes, como seleção por ligação ao ácido hialurônico (PICSI), separação magnética por anexina V (MACS) e dispositivos microfluídicos sem centrifugação, têm sido propostas para minimizar estresse oxidativo e selecionar espermatozoides com cromatina mais íntegra e mitocôndrias funcionais, tanto em humanos quanto em modelos animais (LEE et al., 2010). Plataformas microfluídicas,

ao evitar a centrifugação, compactação celular e exposição prolongada ao oxigênio, reduzem significativamente a produção de EROs e a fragmentação do DNA, preservando a competência fértil e o desenvolvimento embrionário inicial (ASGHAR et al., 2014).

#### **4.9. Capacitação *in vitro*: meios e ambiente**

A capacitação espermática *in vitro* depende de uma complexa interação entre composição do meio, disponibilidade de aceptores de colesterol, sinalização por bicarbonato e cálcio, estado redox intracelular e condições físico-químicas do ambiente, especialmente pH e tensão de oxigênio (GUALTIERI et al., 2021.). Diferentemente do oviduto, onde a capacitação ocorre de forma gradual sob controle peri-ovulatório por moléculas integradas do fluido ovidutal utilizam meios quimicamente definidos que podem acelerar artificialmente esse processo (FERREIRA et al., 2023).

Os meios de capacitação mais utilizados derivam de formulações como TALP, TCM-199, SOF e mTBM, suplementados com bicarbonato, cálcio, albumina e, em diversos protocolos, heparina (PARRISH et al., 1988). A heparina, um glicosaminoglicano, atua como agente de capacitação bem estabelecido em bovinos, induzindo mudanças na membrana espermática, amplificando a fosforilação de proteínas e facilitando a capacidade de RA após incubação em até 4 horas (PARRISH., 1989; CHAMBERLAND et al., 2001). Um componente chave mediado por bicarbonato de cálcio é a ativação da adenilato ciclase solúvel (sAC), que aumenta os níveis de cAMP intracelular e promove a fosforilação de proteínas associadas à capacitação espermática, especialmente na cauda, associada à hipermotilidade (ICKOWICZ et al. 2012; LIAUDAT et al., 2023). A BSA, presente na maioria dos meios, exerce papel fundamental na remoção de colesterol, promovendo a desestabilização controlada da membrana plasmática e a reorganização dos microdomínios lipídicos (VISCANTI et al., 1995; TRAVIS & KOPF, 2002).

Além dos meios, as condições atmosféricas também são importantes. Neste contexto, a tensão de oxigênio constitui modulador central do microambiente de capacitação e fecundação. No oviduto de mamíferos, a pressão parcial de O<sub>2</sub> situa-se entre 2 e 8%, dependendo da região e da fase do ciclo estral (FISCHER & BAVISTER,

1993). Entretanto, a maioria dos protocolos de FIV ainda ocorre sob 20% de O<sub>2</sub>. A redução da tensão de O<sub>2</sub> para níveis fisiológicos em gotas de FIV demonstrou melhorar a competência espermática de pacientes oligozoospermicos (GRIVEAU et al. 1998).

#### **4.10. Tempo de interação entre gametas *in vitro***

O tempo de coincubação entre espermatozoides e oócitos constitui um dos parâmetros operacionais centrais da FIV, influenciando diretamente a dinâmica de interação gamética, a eficiência de fecundação e os eventos iniciais do desenvolvimento embrionário. Historicamente, esse intervalo tem sido definido de forma relativamente empírica, baseado em protocolos consolidados e em considerações práticas de laboratório, mais do que em uma fundamentação fisiológica comparativa entre espécies. Entretanto, evidências experimentais acumuladas ao longo das últimas décadas indicam que a janela temporal necessária para a penetração espermática e ativação oocitária pode variar substancialmente conforme a espécie, o sistema de FIV e as condições de cultivo empregadas.

Diante dessa variabilidade, a investigação sistemática do tempo de coincubação gamética emerge como uma abordagem relevante para compreender seus efeitos sobre a fecundação, a qualidade embrionária e a ocorrência de eventos indesejáveis, como polispermia e estresse celular. Neste sentido, foram reunidos estudos publicados nas principais bases de dados eletrônicas, incluindo *PubMed*, *Scopus*, *Consensus*, *Google Scholar*. Estudos relevantes publicados até janeiro de 2026 foram identificados utilizando os seguintes termos: "Short-duration IVF", "Conventional IVF", "Short-duration IVF versus conventional IVF", "Brief gamete co-incubation", "Prolonged sperm–oocyte interaction", "Short versus conventional gamete co-incubation" and "Short sperm–oocyte interaction". Estudos foram excluídos se não tivessem um protocolo de processamento de sêmen e coletas claramente definidos ou apresentassem dados redundantes. Após a triagem, 23 estudos foram considerados elegíveis para inclusão na **Tabela 1**.

#### **4.11. Variações de protocolo na fecundação *in vitro* de curta duração em mamíferos não humanos**

A duração da coincubação espermatozoide-oócito representa um dos parâmetros mais antigos e, paradoxalmente, menos refinados da FIV em mamíferos. Protocolos clássicos utilizando a incubação *overnight*, de 16 a 20 horas, foram originalmente definidos por conveniência operacional e analogia com eventos *in vivo*, mas evidências acumuladas nas últimas décadas demonstram que o tempo de exposição dos gametas modula profundamente não apenas a eficiência da fecundação, mas também a qualidade dos embriões resultantes (WARD et al., 2002; SUMATRI et al., 1997; ENKHMAA et al., 2009; ANZALONE et al., 2021).

Em bovinos, os resultados disponíveis revelam notável heterogeneidade entre estudos, com tempos ótimos variando entre 3 e 24 h, dependendo do touro, do meio de fecundação, da concentração espermática e das condições de cultivo (SUMATRI et al., 1997; REHMAN et al., 1994; WARD et al., 2002; KOCHHAR et al., 2003; IWATA et al., 2008; SATTAR et al., 2011; FERRÉ et al., 2016). Ward et al. (2002) observaram estabilização das taxas de desenvolvimento embrionário com aproximadamente 10 h de coincubação, enquanto Sumatri et al. (1997) relataram redução significativa da polispermia e aumento na produção de blastocistos com apenas 5 h de FIV, embora com observado efeito do touro utilizado. Por outro lado, Rehman et al. (1994) descreveram máximas taxas de fecundação entre 20 e 24 h, sem prejuízo aparente ao desenvolvimento embrionário inicial.

Essa variabilidade de resultados sugere que o tempo de FIV não atua como um fator isolado, mas integra interações envolvendo a cinética de capacitação espermática, efeito isolado do reprodutor e as propriedades físico-químicas do microambiente *in vitro* (PALOMO et al., 2010; SATTAR et al., 2011). Estudos em ovinos e caprinos reforçam esse conceito, demonstrando que a máxima proporção de espermatozoides viáveis com acrossomo reagido ocorre entre 8 e 12 h, coincidindo com as maiores taxas de penetração (PALOMO et al., 2010; TAN et al., 2011). Em bubalinos, tempos intermediários (8 a 16 h) foram associados à maior conversão de embriões clivados em blastocistos, enquanto períodos mais longos aumentaram a incidência de polispermia (GASPARRINI et al., 2004, 2008).

Modelos suínos forneceram evidências particularmente robustas a favor da FIV curta. Protocolos de 10 a 20 minutos ou até 2 a 4 h reduzem drasticamente a polispermia e aumentam a eficiência da fecundação e a contagem celular dos blastocistos (KOO et al., 2005; ALMIÑANA et al., 2008; KWAK & HYUN, 2012; OBERLENDER et al., 2016). De forma semelhante, Anzalone et al. (2021) demonstraram em ovinos que apenas 4 h de interação gamética são suficientes para completar a fecundação, reduzindo significativamente a polispermia e aumentar a taxa de blastocistos, sem comprometer a proporção entre massa celular interna (MCI) e trofoblasto.

Além da polispermia, a interação gamética prolongada pode intensificar processos oxidativos no microambiente de fecundação. Enkhmaa et al. (2009), utilizando embriões murinos, demonstraram aumento exponencial dos níveis de EROs após 12 a 18 h de coincubação, acompanhado por maior degeneração embrionária e menor competência de desenvolvimento. Esses achados sustentam a hipótese de que o ambiente de fecundação prolongada favorece o equilíbrio redox, capaz de afetar estruturas celulares sensíveis, como o zigoto pré-formado, com repercussões tardias sobre o metabolismo e a viabilidade embrionária.

Outro aspecto relevante é a proporção sexual dos embriões associada ao tempo de FIV. Kochhar et al. (2003) e Iwata et al. (2008) observaram aumento significativo da proporção de embriões masculinos após períodos curtos de coincubação (5 - 6 h), enquanto posições prolongadas aumentaram a polispermia sem alterar consistentemente a razão sexual.

No contexto específico de bovinos zebuínos (*Bos indicus*), a base experimental permanece surpreendentemente limitada. O estudo clássico de Dode et al. (2002) avaliou quatro tempos (3, 6, 12 e 18 h) e demonstrou que 12 h de FIV maximizam penetração e clivagem sem aumento de polispermia. Embora esse resultado tenha sido amplamente adotado na prática, ele contrasta com a diversidade de respostas observadas em *Bos taurus* e em outras espécies, onde tempos mais curtos frequentemente resultam em embriões com maior número de células e melhor qualidade morfológica (BERLAND et al., 2011; ANZALONE et al., 2021; FERRÉ et al., 2016).

É particularmente relevante notar que, mesmo quando taxas de clivagem e blastocisto não diferem, diferenças consistentes são observadas na contagem celular total e na proporção de células da MCI, parâmetros fortemente associados à competência de implantação e ao desenvolvimento subsequente (BERLAND et al., 2011; ALMIÑANA et al., 2008; KOO et al., 2005). Essas observações levantam a possibilidade de que o tempo de FIV atue como modulador precoce de processos regulatórios embrionários finos, que não se manifestam necessariamente nas taxas clássicas de produção embrionária, mas podem repercutir na morfologia e no metabolismo embrionário.

Considerando que o genoma embrionário bovino é ativado majoritariamente entre os estágios de 8 a 16 células (TELFORD et al., 1990, SIRARD, 2012) pequenas variações no ambiente bioquímico nas primeiras horas pós-fecundação podem influenciar cascatas de sinalização, remodelamento epigenético e padrões iniciais de expressão gênica, com potenciais efeitos persistentes durante o desenvolvimento pré-implantacional e pós-implantacional (WOSSIDL et al., 2011).

Nesse contexto, a ausência de investigações sistemáticas em *Bos indicus* abrangendo intervalos curtos adicionais, associados à caracterização molecular e funcional detalhada dos embriões produzidos, representa uma lacuna metodológica relevante. A maioria dos protocolos atuais assume implicitamente que taxas satisfatórias de clivagem refletem equivalência biológica entre embriões, hipótese que vem sendo progressivamente questionada à luz de dados sobre qualidade embrionária e eventos relacionados a fecundação.

**Tabela 1** – Relação de 23 estudos publicados na literatura até janeiro de 2026 com busca na plataforma Pubmed pelos termos: "Short-duration IVF", "Conventional IVF", "Short-duration IVF *versus* conventional IVF", "Brief gamete co-incubation", "Prolonged sperm–oocyte interaction", "Short versus conventional gamete co-incubation" and "Short sperm–oocyte interaction". Estudos sem descrição do protocolo de processamento de sêmen e coletas foram desconsiderados. Os estudos estão organizados pela espécie, tempos testados, concentração de espermatozoides/mL, agentes capacitantes utilizados, condições atmosféricas, resultados e referência. <sup>1</sup>Concentração espermática: espermatozoides/mL.

<b>Espécie</b>	<b>Tempos testados</b>	<b>Concentração espermática<sup>1</sup></b>	<b>Agente(s) capacitante(s)</b>	<b>Condições atmosféricas</b>	<b>Achados</b>	<b>Referência</b>
Bovino	1, 5, 10, 15 e 20 h	1×10 <sup>6</sup>	TALP e Heparina	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Estabilização das taxas de desenvolvimento com 10h de FIV	Ward et al. (2002); <a href="https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00696-9">10.1016/S0093-691X(02)00696-9</a>
Bovino ( <i>Bos taurus</i> )	5, 10, 15 e 20 h	5×10 <sup>6</sup>	Albumina Sérica Bovina (BSA) e heparina	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Redução da taxa de polispermia e aumento da taxa de blastocisto com 5 h de FIV, a depender do touro	Sumatri et al. (1997); <a href="https://doi.org/10.1016/S0378-4320(97)00052-3">10.1016/S0378-4320(97)00052-3</a>
Bovino	4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 h	1×10 <sup>6</sup>	Heparina	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Taxas máximas de fecundação sem efeito no	Rehman et al. (1994); <a href="https://doi.org/10.1016/0093-691X(94)90195-O">10.1016/0093-691X(94)90195-O</a>

Bovino	6, 9, 12 e 18 h	1×10 <sup>6</sup>	TALP e BSA	5% de CO <sub>2</sub> em ar	desenvolvimento com 20 a 24 h de FIV Aumento das taxas de blastocistos, proporção de embriões masculinos e a contagem células com 6 h de FIV.	Kochhar et al. (2003); <a href="https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00006-X">10.1016/S0378-4320(03)00006-X</a>
Ovino	2 a 3 h e 18 a 20 h	0,5×10 <sup>6</sup>	SOF e 2% de soro ovino inativado pelo calor	6% de CO <sub>2</sub> em ar	Aumento das taxas de desenvolvimento com uso de sêmen convencional, porém queda no sêmen sexado, com 2-3 h de FIV	Morton et al. (2005); <a href="https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.12.004">0.1016/j.theriogenology.2004.12.004</a>
Bubalino ( <i>Bubalus bubalis</i> )	8, 12, 16 e 20 h	2×10 <sup>6</sup>	BSA e Heparina	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Melhores taxas de desenvolvimento com 16 h. Redução das taxas de polispermia em tempos inferiores a 12h.	Gasparrini et al. (2008); <a href="https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.022">10.1016/j.anireprosci.2007.03.022</a>
Bubalino ( <i>Bubalus bubalis</i> )	8 e 20h	2×10 <sup>6</sup>	Heparina	7% de CO <sub>2</sub> em ar	Maior proporção de conversão de embriões clivados em blastocistos com 8h de FIV.	Gasparrini et al. (2004); <a href="https://www.iris.unina.it/handle/11588/118852">https://www.iris.unina.it/handle/11588/118852</a>

Suíno	10 minutos e 6h	Não informado	Meio comercial	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Redução da polispermia e aumentou o número de células dos blastocistos com 10 min de FIV.	Alminana et al. (2008); <a href="https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.00995.x">10.1111/j.1439-0531.2007.00995.x</a>
Bovino	1, 5 e 18h	1×10 <sup>6</sup>	BSA e Heparina	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Aumento da proporção de embriões masculinos com 5 h. Aumento da polispermia em 18h.	Iwata et al. (2008); <a href="https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2007.03.006">10.1016/j.anireprosci.2007.03.006</a>
Caprino	8–14 h e 18–24 h	1×10 <sup>6</sup>	Não informado	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Aumento das taxas de desenvolvimento com 8 – 14 h de FIV	Tan et al. (2011); <a href="http://ijie.um.edu.my/index.php/MJS/article/view/7253">http://ijie.um.edu.my/index.php/MJS/article/view/7253</a>
Bovino	6 e 18h	1 × 10 <sup>7</sup>	BSA e heparina	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Utilizando o meio experimental do estudo há aumento de blastocistos viáveis e da qualidade pós-vitrificação com 18 h de FIV	Nedambale et al. (2006); <a href="https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.04.044">10.1016/j.theriogenology.2006.04.044</a>
Suíno	5, 20, 90 e 360 minutos	0,5×10 <sup>6</sup>	Meio comercial	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Melhores taxas de fecundação monospérmica, clivagem e blastocistos com 20 minutos de FIV.	Kwak & Hyun (2012); <a href="https://makhillpublications.co/files/published-files/mak-java/2012/8-1087-1095.pdf">https://makhillpublications.co/files/published-files/mak-java/2012/8-1087-1095.pdf</a>

Bovino	3h, 6h e 18h	$1,5 \times 10^6$	TALP e BSA	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Aumento no número celular de blastocistos sem alterar taxas em 3 h de FIV.	Berland et al. (2011); <a href="https://doi.org/10.5402/2011/257627">10.5402/2011/257627</a>
Bovino ( <i>Bos taurus</i> )	8h e 18h	$1 \times 10^6$	TALP, BSA e indutores de hipermotilidade (estudo teste)	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Estabilidade nas taxas de desenvolvimento independente do meio utilizado com 8 h de FIV.	Ferré et al. (2016); <a href="https://doi.org/10.1071/RD15289">https://doi.org/10.1071/RD15289</a>
Suíno	1 h, 2 h e 3 h	$4 \times 10^5$	TALP e BSA	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Melhores taxas de fecundação monospérmica em 2h de FIV.	Oberlender et al. (2016);.1590/S0100-736X2016001300009
Bovino ( <i>Bos taurus</i> )	4, 8, 12, 16 e 20 h	$1 \times 10^6$	BSA e Heparina	5% de CO <sub>2</sub> em ar	Melhores taxas de blastocistos em touros de penetração rápida com 8h de FIV.	Sattar et al. (2011); <a href="https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2011.01791.x">10.1111/j.1439-0531.2011.01791.x</a>
Ovino	2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 24 e 28 h	$4 \times 10^6$	Heparina	5% de CO <sub>2</sub> em ar	A maior porcentagem de espermatozoides viáveis com reação acrossômica é observada entre 8 e 12 horas. Taxa de penetração máxima ocorre em 12 horas	Palomo et al. (2010); <a href="https://doi.org/10.1017/S0967199410000055">10.1017/S0967199410000055</a>

Ovino	4 e 16h	$5 \times 10^6$	Isoproterenol (16 $\mu$ M) em SOF com soro em estro	5% CO <sub>2</sub> , e 7% O <sub>2</sub>	Redução da polispermia e aumento da taxa e contagem de células dos blastocistos com 4h de FIV.	Anzalone et al. (2021); <a href="https://doi.org/10.1071/RDv32n2Ab119">10.1071/RDv32n2Ab119</a>
Suíno ( <i>Pecari tajacu</i> )	1, 3 e 6h	Não informado	TALP, heparina e cafeína	Não informado	Maximização capacitação e estabilização da motilidade com 3h de FIV.	Santos et al. (2023); <a href="https://doi.org/10.1071/AN23225">10.1071/AN23225</a>
Suíno	2 h, 4 h, 6 h	$0,6 \times 10^5$ ; $1,2 \times 10^5$ ; $2,5 \times 10^5$ ; $5 \times 10^5$	BSA e cafeína	5% CO <sub>2</sub> em ar	Maiores taxas de desenvolvimento independente da concentração, sem alteração na qualidade embrionária com 4h e 6h de FIV	Deog-Bon Koo et al. (2005); <a href="https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2005.01.005">10.1016/j.anireprosci.2005.01.005</a>
Suíno	3, 5, 10 20 h	$1 \times 10^6$	TALP, heparina e cafeína	5% CO <sub>2</sub> em ar	Após tratados com heparina, houveram maiores taxas de desenvolvimento no tempo de 10h.	Namula et al. (2021); 10.5194/aab-64-265-2021
Murino	2, 4, 6, 8, 10, 12 e 18	$2 \times 10^6$	Meio comercial	Não informado	Redução dos níveis de EROS, melhores taxas de desenvolvimento e menor proporção de embriões	Enkhmaa et al. (2009); <a href="https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2007.01036.x">10.1111/j.1439-0531.2007.01036.x</a>

degenerados com 4 – 6 h de FIV						
Aumento das taxas de penetração e clivagem, sem aumento de polispermia, com 12 h de FIV						
Bovino ( <i>Bos indicus</i> )	3, 6, 12 e 18 h	1×10 <sup>6</sup>	Heparina	5% CO <sub>2</sub> em ar		Dode et al. (2002); <a href="https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00148-8">10.1016/S0378-4320(01)00148-8</a>

Síntese dos estudos que avaliaram a fecundação *in vitro* de curta duração em mamíferos não humanos, incluindo espécie, tempos de coincubação espermatozoide-oócito testados (h = horas de FIV), concentração de espermatozoides, agente capacitante do meio, atmosfera gasosa (CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>), principais conclusões quanto à fecundação e qualidade embrionária, e respectivos identificadores autor (ano) e DOI.

## 5. Capítulo 2\* – “Menos é mais: um período curto de coincubação de gametas reduz as taxas de polispermia e melhora a qualidade do embrião em bovinos”

### 5.1. Introdução

No cenário mundial, a produção *in vitro* de embriões (PIVE) representa cerca de 80% do total de embriões bovinos produzidos e transferidos (VIANA, 2024). Apesar de diversos avanços tecnológicos, as taxas de eficiência da PIVE em relação ao desenvolvimento embrionário, implantação e nascimento de bezerros viáveis permanecem inferiores quando comparadas aos resultados obtidos pela produção de embriões *in vivo* (RIZOS et al, 2002; HANSEN, 2013; FERRÉ et al., 2020). Parte dessa limitação decorre da incapacidade inerente dos sistemas *in vitro* de mimetizar, com precisão, o ambiente fisiológico do trato reprodutivo da fêmea (TRF), onde ocorrem interações celulares e moleculares altamente reguladas (KILLIAN, 2011; HOLT & FAZELI, 2016). Embora o ambiente *in vitro* não reproduza exatamente as condições *in vivo*, é essencial compreender os fatores *in vivo* para aprimorar processos.

*In vivo*, em bovinos, após a deposição na vagina, os espermatozoides migram em direção ao lúmen uterino, através do lúmen do canal cervical. Posteriormente, atravessam a junção útero-tubárica (JUT) para alcançar o oviduto, local de fecundação (SUAREZ, 2008). Nesse trajeto, os espermatozoides interagem com fatores presentes no TRF e sofrem processos de seleção e modulação, como a remoção de proteínas inibitórias e a ativação de vias de sinalização que culminam na capacitação espermática (SUAREZ & PACEY, 2005). Esse processo envolve alterações bioquímicas e estruturais, como mudanças na fluidez da membrana, fosforilação de proteínas e hiperativação da motilidade (HUNTER & GADEA, 2015). Após a deposição no TRF, os espermatozoides chegam ao oviduto em 30 a 60 minutos, se ligam às células epiteliais do istmo, formando um reservatório de espermatozoides, onde podem permanecer por até 48 horas (HUNTER & GADEA, 2015; CAMARA PIREZ et al., 2020). Uma vez ocorrida a ovulação, modificações bioquímicas do fluido ovidutal estimulam a liberação de espermatozoides e a sua quimioatração ao oócito recém ovulado (GWATHMEY et al., 2003; SUAREZ, 2008).

\*Este capítulo foi extraído do artigo submetido para publicação.

Após a sinalização, os espermatozoides migram em direção à ampola do oviduto, passando por modificações estimuladas por componentes de seu fluido, como as glicoproteínas (LEE & AX, 1984). Essas modulações desencadeiam hipermotilidade espermática, fosforilação de tirosina e reação acrossomal, ocorrendo cerca de 1 hora após a liberação dos espermatozoides (NAZ & RAJESH, 2004). Após a ovulação, a exocitose dos grânulos corticais (i.e., reação cortical) torna-se detectável em 2 a 3 horas, indicando o sucesso da fecundação, e por volta de uma hora surgem os primeiros sinais de formação dos pronúcleos masculino e feminino (HYTTEL & GREEVE & CALLESEN, 1988). Assim, estima-se que o espermatozoide fecunde o oócito aproximadamente 1 hora após a ovulação em bovinos.

Por outro lado, na fecundação *in vitro* (FIV), após a seleção por ferramentas como gradiente de densidade ou *swim-up* (HENKEL & SCHILL, 2003), os espermatozoides são depositados em gota com meio adequado contendo oócitos presumivelmente maturados e preparados para a fecundação (KARUNAKARAN & DEVANANTHAN, 2016). No meio de FIV, os espermatozoides encontram componentes como heparina, bicarbonato e cálcio (MACÍAS-GARCÍA et al., 2015), que promovem alterações bioquímicas relacionadas à capacitação espermática e, assim, desencadeiam a hiperativação espermática, a fosforilação da tirosina e a reação acrossomal, possibilitando a ligação do espermatozoide com o oócito. Espermatozoides bovinos, em contato com componentes, como a heparina, tornam-se susceptíveis à reação acrossomal e fecundam o oócito em aproximadamente 4 horas (PARRISH et al., 1988). *In vitro*, cerca de 50 minutos após as modulações relacionadas à capacitação, os espermatozoides penetram a zona pelúcida em bovinos. Além disso, a formação pronuclear é detectada uma hora após a penetração, totalizando um período de aproximadamente duas horas desde a capacitação espermática os primeiros indícios da fecundação (KIM et al. 2002) A partir dessas observações, estima-se que espermatozoide fecunde o oócito 4 a 6 horas após a deposição na gota de FIV. Estudos descritivos da cronologia do desenvolvimento pronuclear observaram que a penetração do espermatozoide ocorre já com 4 horas após a deposição dos espermatozoides em contato com os oócitos *in vitro*, atingindo um pico às seis horas, com a início da formação pronuclear por volta das 4 horas e desenvolvimento sequencial até cerca de 11 horas, com a identificação do pronúcleo materno e paterno

(LAURINCÍK et al., 1998), demonstrando que tempos excessivos de interação entre gametas podem ser dispensáveis em quesito de eficiência da fecundação.

Embora a fecundação ocorra nas primeiras horas de contato entre espermatozoides com oócitos maturados tanto *in vivo* quanto *in vitro*, normalmente o período de FIV consiste em 16 a 20 horas de coincubação dos espermatozoides com oócitos em bovinos (GORDON, 2003; NAZARI, 2022). Estudos anteriores demonstraram que redução do tempo de coincubação entre espermatozoides e oócitos melhora a qualidade embrionária em suínos e ovinos, aumentando as taxas de desenvolvimento embrionário e reduzindo incidência de polispermia (GIL et al., 2007; ANZALONE et al., 2021). Em humanos, a redução do período de FIV em 2 horas aumentou a taxa de implantação (GIANAROLI et al., 1996). Em bovinos, alguns estudos também relataram efeitos benéficos de períodos de coincubação menores, associados à melhoria da qualidade do embrião, maior número de células e redução de fecundação polispérmica, quando comparados com as condições padrão de FIV de maior período (DODE et al., 2002; BERLAND et al., 2011; SATTAR et al., 2011). Em murinos, o longo período de interação entre gametas foi associado a elevados níveis de espécies reativas ao oxigênio (EROs) no meio de fecundação e a uma maior proporção de embriões fragmentados (ENKHMAA & KASAI & HOSHI, 2009). Embora evidências demonstrem efeitos positivos associados à redução do período de interação entre gametas, os mecanismos envolvidos e as consequências dessa alteração no desenvolvimento embrionário ainda não são totalmente compreendidos.

Uma problemática evidenciada anteriormente associada períodos prolongados de fecundação foi o aumento da polispermia, que consiste na entrada de mais de um espermatozoide no citoplasma oocitário (DUCIBELLA, 1996). Em condições normais, após a entrada do primeiro espermatozoide, o oócito executa dois mecanismos de defesa contra espermatozoides acessórios potencialmente fecundantes. O primeiro mecanismo, denominado bloqueio rápido, consiste na despolarização da membrana devido a oscilações de  $Ca^{+2}$ , ativada frações de segundo após a entrada do espermatozoide (WOZNIAK & CARLSON, 2020). O segundo, denominado bloqueio lento, envolve a exocitose de grânulos corticais, cujo conteúdo se desloca do revestimento citoplasmático na periferia do oócito para o espaço perivitelínico (WANG et al., 1997). Além disso, novos mecanismos têm sido descritos, como a ligação entre JUNO-IZUMO. Neste mecanismo, a JUNO, uma proteína ancorada ao oolema que

serve como receptor para IZUMO-1 no espermatozoide, é rapidamente liberada em vesículas extracelulares após a fecundação. Essas vesículas atuam como iscas moleculares que se ligam a espermatozoides acessórios, reforçando assim o bloqueio da membrana à polispermia (BIANCHI et al., 2014; BHAKTA & REFAI & AVELLA, 2019). Esses mecanismos devem ocorrer de forma orquestrada e sincrônica, que podem ser alteradas pelas condições *in vitro*.

Além do aumento da taxa de embriões polispérmicos, *in vitro* observa-se que 30% dos embriões apresentam anomalias cromossômicas, em contraste com 15% *in vivo* (VIUFF et al. 1999; YAN et al., 2018). Da mesma forma, altos níveis de EROs no meio têm sido associados a períodos prolongados de FIV, gerados predominantemente pela atividade mitocondrial dos espermatozoides mantidos em meios de cultura ricos em substratos energéticos e expostos à tensão de oxigênio atmosférico (KOPPERS et al., 2008). Além disso, a viabilidade espermática dura aproximadamente 2 horas (BOTTA et al., 2019) e os espermatozoides mortos atuam como fonte de EROs na gota de FIV, através da via da L-aminoácido oxidase aromática (ROCA et al., 2013). Em níveis fisiológicos, as EROs desempenham funções essenciais, promovendo eventos cruciais da capacitação espermática e fusão gamética (AMARAL et al., 2013); no entanto, quando em excesso, causam um desequilíbrio redox conhecido como estresse oxidativo, que culmina na peroxidação lipídica das membranas espermáticas, fragmentação do DNA espermático, danos mitocondriais e oxidação de proteínas estruturais dos espermatozoides, além de prejudicar a motilidade; comprometendo diretamente a competência espermática (GAVRILIOUK & AITKEN, 2015).

Além de prejudicar o potencial fértil dos espermatozoides, o desequilíbrio redox também influencia o desenvolvimento embrionário, especialmente devido à alta vulnerabilidade do embrião nos estágios iniciais. Essa suscetibilidade está relacionada ao fato de o zigoto recém-formado possuir reservas antioxidantes limitadas, herdadas do oócito (ASHWOOD-SMITH & EDWARDS, 1996) e depender, quase exclusivamente, de proteínas e transcritos maternos para neutralizar o estresse oxidativo até a ativação do genoma embrionário, que ocorre entre os estágios de 8 e 16 células em bovinos (TELFORD et al., 1990, SIRARD, 2012). Assim, o desequilíbrio redox imposto ao zigoto e a exposição prolongada ao microambiente oxidativo podem não apenas induzir modificações epigenéticas, mas também comprometer processos bioenergéticos essenciais, reduzir a competência para a primeira clivagem e aumentar

a incidência de apoptose em blastômeros subsequentes (SILVA et al. 2007, DE CASTRO et al., 2016). Além disso, a permanência prolongada de zigotos em meio de FIV pode comprometer a viabilidade embrionária, visto que esse meio carece de componentes presentes em meios de cultura embrionária, como o Fluido Sintético do Oviduto (SOF), que são fundamentais para o desenvolvimento embrionário inicial (THOMPSON et al., 1998).

Considerando que a fecundação *in vivo* ocorre em ambiente ovidutal altamente regulado, no qual a interação dos gametas é breve e sincronizada, sendo concluída em cerca de 1 a 2 horas após a ovulação, e que *in vitro* a etapa de FIV dura de 16 a 20 horas, mesmo que os eventos cruciais da fecundação ocorram nas primeiras 4 a 6 horas após a deposição de espermatozoides em meio de FIV em contato com os oócitos, o objetivo do presente estudo consistiu em investigar os efeitos da redução do tempo de coincubação espermatozoide-oócito no desenvolvimento embrionário inicial em bovinos. Espera-se que a redução do tempo de exposição gamética à etapa de FIV minimize os efeitos deletérios da fecundação prolongada, como o estresse oxidativo e a polispermia, promovendo melhores indicadores de qualidade embrionária sem comprometer a taxa de fecundação.

## **5.2. Material e métodos**

### **5.2.1. Declaração de Ética**

Todos os procedimentos realizados neste estudo foram conduzidos de acordo com as diretrizes éticas para pesquisa e cuidados com animais e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (CEUA/FCAV), sob o protocolo nº 512/23. Todas as imagens esquemáticas foram criadas pelos autores ou obtidas da plataforma BioRender (<https://www.biorender.com/>).

### 5.2.2. Reagentes e condições de cultivo

Todos os reagentes e produtos químicos utilizados foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), exceto quando especificados. As condições de incubação para oócitos, espermatozoides e embriões foram em incubadora com temperatura de 38,5°C, sob 5% de CO<sub>2</sub> em ar (20% de oxigênio) com umidade saturada.

### 5.2.3. Delineamento experimental

Para o estudo, dois experimentos foram conduzidos utilizando ovários de abatedouro para coletar complexos *cúmulo-oócito* (CCOs) e partidas de sêmen criopreservado de cinco touros da raça Nelore (*Bos indicus*), sendo utilizada uma única partida de cada touro, para obtenção dos espermatozoides. As partidas foram previamente avaliadas quanto às características espermáticas morfofuncionais e ao potencial fértil espermático *in vitro*, para garantir que as amostras fossem adequadas para uso.

No Experimento 1, o total de 1.375 CCOs presumivelmente maturados *in vitro* foram coincubados com  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL sendo distribuídos em seis grupos de acordo com o período de interação entre espermatozoides, a saber: 2, 4, 6, 8, 10 e 16 horas de FIV. Após o início do período de FIV (ou seja, da deposição de espermatozoides), as taxas de desenvolvimento embrionário da primeira clivagem às 28 horas pós-inseminação (hpi), a clivagem avaliada às 96 hpi e o blastocisto às 168 hpi foram avaliadas. Após 168 hpi, os blastocistos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento e fixados para contagem do número de células. Todos os dados foram utilizados para determinar o período curto de FIV a ser testado no Experimento 2. Para este experimento, foram realizadas cinco rotinas de produção *in vitro* sendo utilizada uma partida de cada touro por rotina.

No Experimento 2, o total de 1.430 CCOs presumivelmente maturados *in vitro* foram coincubados com  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL e distribuídos em dois grupos: (1) Período curto de FIV (Shrt/IVF; 8 horas), com base nos resultados do Experimento 1; e (2) Controle (Ctrl/IVF; 16 horas), com base no período mínimo utilizado na FIV

convencional. Os presumíveis embriões foram cultivados e as taxas de fecundação e polispermia às 12 hpi, primeira clivagem às 28 hpi, clivagem às 96 hpi e blastocisto às 168 hpi foram avaliadas. Às 28 hpi, os embriões de primeira clivagem foram coletados para análise dos níveis de transcritos. Às 96 hpi, os embriões clivados foram coletados para avaliação do número de células e da taxa de proliferação, bem como dos níveis de transcritos. Às 168 hpi, os blastocistos foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento e fixados para avaliação do número de células e da proliferação. Adicionalmente, os zigotos foram coletados ao final da FIV curta e da FIV controle para avaliar a produção de EROs, totalizando três momentos de coleta, a saber: (1) imediatamente após a FIV curta (Shrt/IVF-8h), (2) após 16 horas, sendo o tempo da FIV curta mais o tempo de desenvolvimento até completar 16 horas (Shrt/IVF-16h); e (3) imediatamente após a FIV controle (Ctrl/IVF-16h). Para este experimento, foram utilizadas três partidas de dose de sêmen criopreservado, sendo realizadas duas repetições por partida. As partidas de sêmen foram selecionadas a partir dos resultados do Experimento 1, de acordo com a homogeneidade da qualidade espermática e as taxas de desenvolvimento embrionário. No total, foram realizadas seis rotinas de produção *in vitro*.

#### **5.2.4. Avaliação das características morfofuncionais dos espermatozoides e do potencial fértil *in vitro***

Partidas de sêmen criopreservado de cinco touros da raça Nelore (*Bos indicus*) foram avaliadas quanto à qualidade morfofuncional dos espermatozoides e ao potencial fértil *in vitro*. As avaliações morfofuncionais dos espermatozoides incluíram motilidade, vigor, total de espermatozoides na dose, total de espermatozoides móveis na dose, morfologia espermática e avaliação de integridade da membrana plasmática. O potencial fértil foi avaliado com base no desempenho na produção de embriões *in vitro*, obtido por meio de duas rotinas convencionais. As taxas de clivagem (96 hpi) e de formação de blastocistos (168 hpi) foram avaliadas. Todas essas características foram avaliadas pelo mesmo técnico.

A motilidade total (%) e o vigor (pontuações de 1 a 5) foram avaliados subjetivamente utilizando um microscópio de contraste de fase com aumento de 100x

(CX43, Olympus, Tóquio, Japão). O número de espermatozoides na dose foi calculado com base na concentração espermática avaliada em câmara de Neubauer após diluição de 1:100 em solução salina tamponada com fosfato contendo 4% de formaldeído, sob microscopia de contraste de fase com aumento de 400× (CX43, Olympus, Tóquio, Japão). A morfologia espermática foi avaliada fixando-se as amostras em solução salina tamponada com fosfato pré-aquecida contendo 4% de formaldeído, analisando 200 espermatozoides sob microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC 80i, Nikon, Tóquio, Japão). Os defeitos morfológicos foram classificados como maiores, menores ou totais de acordo com Blom (1973). A integridade da membrana plasmática foi avaliada por citometria de fluxo (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, EUA) utilizando dois lasers (azul: 488 nm; vermelho: 635 nm) e quatro detectores de fluorescência (FL1: 533/30 nm; FL2: 585/40 nm; FL3: >670 nm; FL4: 675/25 nm). As análises foram realizadas seguindo Andrade (2009), com modificações para o equipamento mencionado. Os marcadores fluorescentes utilizados foram SYTO-59 (750 mM; S11341) e iodeto de propídio (0,5 mg/mL; P4170).

#### **5.2.5. Produção de embriões *in vitro* (PIVE)**

Para a produção de embriões *in vitro*, ovários provenientes de abatedouro local foram coletados e transportados para o laboratório em um recipiente contendo solução salina estéril (0,9% NaCl) a 35°C. No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina e apenas os folículos com diâmetro entre 3 e 6 mm foram aspirados utilizando uma agulha hipodérmica de calibre 18G. O fluido folicular foi utilizado para selecionar os CCOs em um estereomicroscópio (modelo SMZ 745T, Nikon, Tóquio, Japão). Apenas os CCOs de grau I e II foram selecionados e lavados em meio de lavagem TCM-199 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 22 µg/mL de piruvato de sódio e 50 µg/mL de gentamicina e em meio de maturação TCM-199 suplementado com 26 mM de bicarbonato de sódio, 10% de SFB, 0,2 mM de piruvato de sódio, 50 µg/mL de gentamicina, 0,5 µg/mL de hormônio folículo-estimulante (FSH; Foltropin®, Bioniche Animal Health, Belleville, Canadá) e 50 µg/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG, Chorulon®, MSD Animal Health, Rahway, Estados Unidos). Em seguida, os CCOs foram transferidos para gotas de 90 µL de meio de maturação cobertas com óleo mineral (FUJIFILM

Irvine Scientific, Santa Ana, Califórnia, EUA), distribuindo de 20 a 25 CCOs por gota, permanecendo em maturação por 22 a 24 horas. Após a maturação, os CCOs foram lavados em meio de fecundação *in vitro* (meio de Tyrodes-lactato suplementado com 50 µg/mL de gentamicina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10 µg/mL de heparina, 18 mM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina, 1,8 µM de epinefrina e 6 mg/mL de BSA) e colocadas em gotas de 90 µL de meio de FIV cobertas com óleo mineral. Para a FIV, os espermatozoides das partidas de sêmen criopreservado foram selecionados por mini gradiente de Percoll® (GE Health, Uppsala, Suécia) (45% e 90%), ajustando a concentração final de espermatozoides móveis para  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL na gota de FIV. No Experimento 1, o período de FIV foi de 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h ou 16 h, e no Experimento 2, o período de FIV foi de 8 ou 16 horas. Ao final de cada período de FIV, os zigotos presumidos foram desnudos por pipetagem, restando apenas uma camada de células do *cumulus*. Os embriões presumidos foram lavados e cultivados em gotas de 90 µl de meio de cultivo composto por fluido ovidutal sintético com aminoácidos, citrato de sódio e inositol (SOF), suplementado com 5 mg/mL de BSA, 22 µg/mL de piruvato de sódio, 50 µg/mL de gentamicina e 2,5% de SFB.

#### **5.2.6. Classificação do estágio de blastocisto**

Os blastocistos foram coletados às 168 hpi e classificados de acordo com os padrões morfológicos estabelecidos pela Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS, 1998). Quatro categorias de desenvolvimento embrionário foram consideradas: blastocisto inicial (início da formação da blastocèle, ocupando até 50% do volume embrionário), blastocisto típico (clara formação da blastocèle, ocupando mais que 50% do volume embrionário), blastocisto expandido (blastocèle predominante, embrião com volume aumentado e com zona pelúcida fina) e blastocisto eclodido (com ruptura parcial ou total da zona pelúcida). A avaliação foi realizada pelo mesmo técnico.

#### **5.2.7. Avaliação do número de células do blastocisto**

Os blastocistos foram coletados 168 hpi para contagem do número de células totais. Um total de 13 a 25 blastocistos foram avaliados por grupo experimental, e cada repetição contribuiu com pelo menos cinco embriões. Após a coleta, os blastocistos foram lavados três vezes em PBS (Solução Salina Tamponada com Fosfato: 0,8 mg/mL NaCl, 0,2 mg/mL KCl, 1,44 mg/mL Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> e 0,24 mg/mL KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>).com 0,1% de PVP e fixadas por 15 minutos em paraformaldeído a 4% (PFA) diluído em PBS + 0,1% de PVP. A permeabilização celular foi realizada com Triton X-100 a 1% por 20 minutos. Posteriormente, os embriões foram corados com Hoechst 33342 (10 µg/mL) por 15 minutos à temperatura ambiente. A montagem foi realizada com ProLong Antifade® (Thermo Fisher Scientific, CA, EUA). A leitura foi conduzida por microscopia de fluorescência (Olympus IX70, Japão), com filtro U-MWU (excitação 330–385 nm, emissão 360–370 nm), objetiva de 400x e as imagens foram capturadas no software AxioVision® (versão 4.7; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha). As imagens foram analisadas com o software ImageJ® (NIH;<https://imagej.nih.gov/ij/>), com auxílio da ferramenta *Cell Counter*. Além disso, a fórmula “**número de divisões celulares = log<sub>2</sub>(número total de células)**” (Alves et al., 2019) foi aplicada para estimar o número de divisões celulares.

#### **5.2.8. Avaliação das taxas de fecundação e polispermia**

Os presumidos zigotos foram desnudados com 12 hpi com o auxílio de tripsina e submetidos à lise da zona pelúcida com uma solução de 0,5% de Pronase (*Streptomyces griseus*), de acordo com Alves et al. (2019). Após a remoção completa da zona pelúcida, os embriões foram lavados três vezes em PBS + PVP 0,1% e fixados em PBS + PVP 0,1% + PFA 4% por 15 minutos e corados com Hoechst 33342 por 15 minutos. Para montagem das lâminas, foram utilizados 7 µL de Prolong Antifade (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA), e os embriões foram cobertos com uma lamínula de 22 x 22 mm. Os embriões foram analisados por microscopia de fluorescência (Olympus IX70, Tóquio, Japão) com um filtro U-MWU (excitação 330-385 nm e emissão 360-370 nm) e com aumento de 400x. Foram considerados as seguintes classificações: (I) não fecundado, com visualização de apenas um núcleo (PN=1); (II) fecundado, com a visualização de dois pronúcleos (PN=2); e (III)

polispérmico, com a visualização de três ou mais pronúcleos e/ou espermatozoides (PN>2).

### **5.2.9. Avaliação da taxa de proliferação por imunofluorescência**

Doze embriões de cada categoria (8 a 32 células – 96hpi e Blastocistos – 168hpi) do Experimento 2 foram coletados 168 horas após a FIV curta (Shrt/IVF) e doze do FIV controle (Ctrl/IVF), sendo analisados dois embriões de cada categoria por rotina. Após a coleta, os embriões foram lavados e fixados em PBS + PVP 0,1% + PFA 4% por 15 minutos. A permeabilização foi realizada com Triton X-100 a 1% por 20 minutos. O bloqueio de sítios não específicos foi feito com BSA a 5% e glicina a 22 mg/mL por uma hora à temperatura ambiente. Os embriões foram incubados durante a noite a 4° C com o anticorpo primário Anti-Ki67 Recombinant Monoclonal Rabbit (1:400; Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA; Número de referência: AB\_10979488), diluído em PBS com 1% de BSA sob agitação na mesa agitadora orbital TE-141 (Tecnal Equipamentos, Brasil). Após três lavagens, os embriões foram incubados por uma hora a 37° C com anticorpo secundário anti-IgG de cabra/coelho (H+L) adsorvido por via cruzada, Alexa Fluor™ 488 (1:1000; Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA; Número de referência: AB\_2633280). Adicionalmente, foram realizadas lavagens para eliminar reações inespecíficas de anticorpos. Em seguida, os embriões foram corados com Hoechst 33342 (10 µg/mL) por 15 minutos e montado com ProLong Antifade (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA). O controle negativo foi realizado pela ausência do anticorpo primário na fase de incubação. A leitura foi feita em microscópio confocal SP5 (Leica, Alemanha) com lasers de 405 nm e 488 nm, usando ampliação de 400x em imersão em óleo. As imagens foram analisadas com o ImageJ® (NIH;<https://imagej.nih.gov/ij/>) Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA, considerando: (I) número total de células (Hoechst +, azul); (II) número de células em proliferação (Ki-67+, verde); (III) porcentagem de células em proliferação (Ki-67+/células positivas para Hoechst+\*100).

### **5.2.10. Análise da expressão gênica por qPCR**

As coletas para análise molecular foram realizadas simultaneamente à avaliação da cinética do desenvolvimento embrionário, em dois momentos distintos: 28 hpi, correspondendo à primeira clivagem; e 96 hpi, referente ao estágio de clivagem entre 8 e 32 células. Para a coleta às 28 hpi, foram selecionados apenas embriões no estágio de duas células. Estes foram submetidos à lise da zona pelúcida com solução de Pronase a 0,5% (*Streptomyces griseus*) e, em seguida, lavados em PBS + PVP a 0,1%. Em todas as coletas, as estruturas selecionadas foram lavadas três vezes em PBS + PVP a 0,1%, agrupadas em conjuntos de 10 embriões e, posteriormente, submetidas a congelamento ultrarrápido (congelamento instantâneo) em nitrogênio líquido, sendo armazenadas a -80 °C até a extração de RNA e análise por RT-qPCR.

A extração de RNA total foi realizada a partir de pools contendo 10 embriões por amostra, totalizando seis pools biológicos para cada categoria experimental. A extração foi realizada utilizando RNAzol® RT (St. Louis, MO, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os pellets de RNA foram ressuspensos em 8 µL de água ultrapura livre de RNase/DNase e submetidos a tratamento com DNase I (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) para remover possíveis resíduos de DNA genômico. O tratamento foi realizado em um termociclador utilizando o tampão de reação apropriado, seguido de inativação da enzima com EDTA, de acordo com o protocolo do fabricante. Após o tratamento com DNase, as amostras de RNA foram quantificadas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop™ (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A pureza e a integridade foram avaliadas com base nas razões A260/A280 e A260/A230, sendo considerados aceitáveis valores entre 1,8 e 2,1. A síntese de cDNA foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), seguindo as recomendações do fabricante. As reações foram conduzidas em um termociclador sob as seguintes condições: 25 °C por 10 min, 37 °C por 120 min e 85 °C por 5 min, seguido de resfriamento a 4 °C. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20 °C até ser utilizado nas reações de RT-qPCR.

A quantificação da expressão gênica relativa foi realizada por PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando o sistema QuantStudio™ 6 Flex Real-Time PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações foram conduzidas com o reagente Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e o corante de referência passiva ROX™. Cada reação foi realizada em duplicata técnica,

contendo 30 ng de cDNA por poço e 2  $\mu$ L de cada primer (0,5 nM). A amplificação foi realizada sob as seguintes condições de ciclagem: 95 °C por 10 min (ativação inicial), seguida por 40 ciclos de 95 °C por 15 s e 60 °C por 60 s. Uma análise da curva de fusão foi realizada ao final de cada reação para confirmar a amplificação específica de cada gene alvo, evitando assim a formação de dímeros de primers ou produtos inespecíficos. Três genes de referência endógenos (ACTB, PPIA e RPL15) foram usados para normalização e o  $\Delta$ Ct foi calculado pela diferença entre o gene alvo e a média geométrica dos genes endógenos. A expressão gênica relativa foi calculada usando o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Controles negativos foram incluídos em todas as reações para garantir a ausência de contaminação ou amplificação inespecífica. A expressão de genes relacionados a vias de proliferação celular, apoptose, estresse oxidativo, estresse do retículo endoplasmático e fatores de transcrição foi investigada (**Tabela 2**).

**Tabela 2.** Símbolo do gene, sequência e função dos primers utilizados para RT-qPCR em embriões de 2 células (28 hpi) e de 8 a 32 células (96 hpi).

<b>Símbolo do gene</b>	<b>Sequência do primer (Forward/Reverse)</b>	<b>Função</b>
<b>PCNA</b>	F: GTCCAGGCTCCATCTTGAA R: CAAGGAGACATGAGACGAGT	Proliferação celular
<b>KRAS</b>	F: GCCAGTTAGCTTGGTAGGTGT R: AACCAAGGCATGGCAACAAT	Proliferação celular
<b>CHOP10</b>	F: CAAAGCCGGAACCTGAGGAGA R: TCAGGCTCTGCTTTCAGGTGTG	Estresse do retículo endoplasmático (RE) / Apoptose
<b>PERK</b>	R: CCCGTTTCGGCACTCAAATGG F: TGCACCATGGCATACTCACGA	Estresse do RE
<b>CAT</b>	F: CTATGGCCTCCGCGATCTTT R: CGTGAGGCCAAACCTTGGTA	Estresse oxidativo
<b>SOD1</b>	F: AAGATGAAGAGAGGCATGTTGGA R: GATGGCAACACCGTTTTTGTGTC	Estresse oxidativo
<b>SOD2</b>	F: TCTGTTGGTGTCCAAGGCTC R: AGCAGGGGGATAAAGACCTGT	Estresse oxidativo
<b>GPX1</b>	F: CGGGTTCGAGCCCAACT R: GCGCCTTCTCGCCATTC	Estresse oxidativo
<b>GPX4</b>	F: GCTCATTGAGAACGTAGCAT R: GTACTTCAGGCAATTCAGGAT	Estresse oxidativo
<b>NRF2</b>	F: CCACCAGTACCGCCGTGTC R: ATGTCAATCAAATCCATGTCCTGCT	Estresse oxidativo
<b>KEAP1</b>	F: TCACCAGGGAAGGATCTACG R: AGCGGCTCAACAGGTACAGT	Estresse oxidativo
<b>NQO1</b>	F: GATCGTACTGGCCCACTCAG R: GGGGTCCTTCAGTTTACCTGT	Estresse oxidativo
<b>HO1</b>	F: GTTTTAAGCTGGTGTATGCGT R: TGGAGTCGCTGAACATAGC	Estresse oxidativo

<b>MFN2</b>	F: GTCGCTGTGCATGAAACTGG R: GGTGACAAAGTGCTTGAGCG	Estresse oxidativo / Estresse do RE
<b>KLF17</b>	F: CCCTTCCCAGATGACTTTCA R: GTGGGACATCATTGGGATTC	Fator de transcrição
<b>ACTB</b>	F: GCGGACAGGATGCAGAAA R: ACGGAGTACTTGCGCTCAG	Controle endógeno
<b>PPIA</b>	F: CATAACAGGTCCTGGCATC R: CATAACAGGTCCTGGCATC	Controle endógeno
<b>RPL15</b>	F:CAAACGCCAGTTCCTAAGG R:TCGAGCAAAGTTCGAGCTGGTT	Controle endógeno

### 5.2.11. Detecção de espécies reativas ao oxigênio nos zigotos

Para a quantificação dos níveis de EROs, os zigotos foram coletados após três períodos diferentes: (1) imediatamente após 8 horas de FIV (Shrt/IVF-8h); (2) após 8 horas de FIV mais 8 horas de cultura, totalizando 16hpi (Shrt/IVF-16h); e (3) imediatamente após 16 horas de FIV (Ctrl/IVF-16h). Ao final de cada período, os zigotos presumidos foram completamente desnudados com tripsina e avaliados para verificar a presença da extrusão do segundo corpúsculo polar. Apenas os zigotos fecundados foram corados utilizando 1 µL do reagente CellROX<sup>®</sup> Green (Thermo Fisher Scientific, EUA) a 499 µL de meio SOF em uma placa de cinco poços (WTA<sup>®</sup>, Cravinhos, Brasil), mantendo as amostras incubadas por 30 minutos a 38,5 °C, em estufa com atmosfera controlada e protegidas da luz. Após a incubação, as estruturas foram fixadas em PBS + PVP 0,1% + PFA 4% por 20 minutos. Os controles negativos foram realizados utilizando zigotos submetidos ao mesmo tempo de incubação, mas sem a adição da sonda, permitindo o ajuste dos parâmetros de detecção e evitando a interferência da autofluorescência. As lâminas foram montadas com ProLong<sup>™</sup> Antifade (Thermo Fisher Scientific, Califórnia, EUA) e analisadas no mesmo dia em um microscópio de fluorescência DM1000 (Leica, Alemanha), utilizando uma objetiva de 400x com lasers de 450-490 nm e 515 nm, ajustando a exposição de acordo com o controle negativo para evitar a detecção de autofluorescência. A análise da porcentagem da área fluorescente foi realizada utilizando o software ImageJ<sup>®</sup> (NIH; <https://imagej.nih.gov/ij/>), calibrando previamente a escala e ajustando o limiar

de fluorescência (*Threshold*) com base no controle negativo, mantendo o mesmo valor para todas as imagens analisadas. Nas imagens que apresentaram fluorescência do espermatozoide no citoplasma, a área correspondente foi excluída manualmente, e tanto a área total do embrião quanto a área fluorescente foram determinadas utilizando a ferramenta *Measure*, calculando a razão entre a área fluorescente e a área total do embrião para cada amostra.

### 5.2.12. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada utilizando o software RStudio Integrated Development Environment (Versão 4.4.2.). Variáveis categóricas (taxas de fecundação, polispermia, clivagem e blastocisto) foram avaliadas pelo teste do qui-quadrado. Para variáveis contínuas (número total de células embrionárias, taxa de proliferação e estágio de desenvolvimento) foi aplicada a análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. A porcentagem de fluorescência foi analisada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, com os dados expressos como mediana e valores mínimo e máximo, enquanto os demais resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

Para a análise da expressão gênica, foram incluídos apenas os valores de Ct inferiores a 37, correspondentes às amostras com amplificação eficiente. O valor de  $\Delta Ct$  foi calculado pela normalização dos genes-alvo em relação aos genes de referência endógenos. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e, quando foram detectados desvios da normalidade, os valores discrepantes foram removidos de acordo com critério  $1,5 \times IQR$  (intervalo interquartil). Posteriormente, os dados ajustados foram analisados por meio de ANOVA. Os níveis relativos de expressão gênica foram representados graficamente como  $2^{-\Delta Cq}$ , refletindo a quantificação normalizada dos transcritos. Para todas as análises, adotou-se um nível de significância de  $P < 0,05$ . A tendência estatística foi considerada quando  $0,05 < P \leq 0,10$ .

### 5.3. Resultados

#### 5.3.1. Os espermatozoides provenientes das partidas de sêmen criopreservados apresentaram qualidade morfofuncional e potencial fértil adequados.

Inicialmente, os espermatozoides das partidas de sêmen criopreservado foram analisados quanto aos parâmetros morfofuncionais e ao potencial fértil para garantir a adequação das amostras para uso. No Experimento 1, a motilidade espermática e o vigor foram de  $67,00 \pm 5,21\%$  e  $2,65 \pm 0,15$ , respectivamente. O número total de espermatozoides por dose e o número total de espermatozoides móveis por dose foi de  $35,06 \pm 3,26$  e  $23,63 \pm 3,41$  milhões de espermatozoides. A porcentagem de espermatozoides com defeitos maiores e menores foi de  $7,85 \pm 0,71\%$  e  $2,40 \pm 0,42$ , respectivamente (**Tabela 3**). A integridade da membrana plasmática apresentou uma média de  $54,35 \pm 6,12$  (**Tabela 3**).

O potencial fértil *in vitro* foi avaliado pelas taxas de clivagem e blastocisto, sendo respectivamente,  $49,7 \pm 5,7\%$  e  $22,1 \pm 2,9\%$ , (**Tabela 3**). Para o Experimento 2, três partidas de três destes cinco touros foram selecionadas com base em suas maiores taxas de blastocistos no Experimento 1. Os dados dos três touros selecionados para o Experimento 2 estão demonstrados na **Tabela 4**.

**Tabela 3.** Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros morfofuncionais e do potencial de fertilidade *in vitro* dos espermatozoides obtidos das doses de sêmen criopreservado dos cinco touros utilizados no Experimento 1.

Aspectos morfofuncionais dos espermatozoides e potencial fértil	Média ± EPM
<i>Aspectos morfofuncionais dos espermatozoides</i>	
Motilidade espermática (%)	67,00 ± 5,21
Vigor espermático (1–5)	2,65 ± 0,15
Concentração de espermatozoides (espermatozoides/mL)	140,25 × 10 <sup>6</sup> ± 12,32 × 10 <sup>6</sup>
Total de espermatozoides por dose	35,06 × 10 <sup>6</sup> ± 3,26 × 10 <sup>6</sup>
Total de espermatozoides móveis por dose	23,63 × 10 <sup>6</sup> ± 3,41 × 10 <sup>6</sup>
Defeitos maiores (%)	7,85 ± 0,71
Defeitos menores (%)	2,40 ± 0,42
Defeitos totais (%)	10,25 ± 0,85
Integridade da membrana plasmática (%)	54,35 ± 6,12
<i>Potencial de fértil espermático in vitro</i>	
Clivagem (%)	49,7 ± 5,7 (269/539)
Blastocisto (%)	22,1 ± 2,9 (119/539)

Legenda: Os parâmetros de qualidade do sêmen incluíram motilidade, vigor, concentração espermática, número total e de espermatozoides móveis na dose, defeitos morfológicos e integridade da membrana plasmática.

**Tabela 4.** Média e erro padrão da média (EPM) dos parâmetros morfofuncionais e do potencial de fertilidade *in vitro* dos espermatozoides obtidos das doses de sêmen criopreservado dos três touros utilizados no Experimento 2.

Aspectos morfofuncionais dos espermatozoides e potencial fértil	Média ± EPM
<i>Aspectos morfofuncionais dos espermatozoides</i>	
Motilidade espermática (%)	69,17 ± 8,46
Vigor espermático (1–5)	2,58 ± 0,22
Concentração de espermatozoides (espermatozoides/mL)	135,41 × 10 <sup>6</sup> ± 21,65 × 10 <sup>6</sup>
Total de espermatozoides por dose	33,85 ± 5,41
Total de espermatozoides móveis por dose	23,63 ± 5,97
Defeitos maiores (%)	7,75 ± 1,15
Defeitos menores (%)	2,25 ± 0,75
Defeitos totais (%)	10 ± 1,38
Integridade da membrana plasmática (%)	60,10 ± 5,15
<i>Potencial de fértil espermático in vitro</i>	
Clivagem (%)	48,48 ± 4,74
Blastocisto (%)	20,97 ± 2,04

Legenda: Os parâmetros de qualidade do sêmen incluíram motilidade, vigor, concentração espermática, número total e de espermatozoides móveis na dose, defeitos morfológicos e integridade da membrana plasmática.

### **5.3.2. A interação mínima de 8 horas entre o espermatozoide e o oócito é necessária para taxas adequadas de desenvolvimento embrionário e qualidade do blastocisto formado.**

O período de coincubação gamética durante a FIV exerceu um efeito significativo nas taxas de clivagem e na formação de blastocistos (**Tabela 5**). A taxa da primeira clivagem (28 hpi) foi significativamente menor nos grupos submetidos a 2 e 4 horas de FIV (7,59% e 16,31%, respectivamente) em comparação com os grupos de 6, 8, 10 e 16 horas, cujos valores foram de 28,82%, 33,33%, 32,89% e 30,94%, respectivamente (**Tabela 5**). Esses achados indicam que períodos inferiores a 6 horas foram insuficientes para garantir uma fecundação eficiente. Da mesma forma, a taxa de clivagem (96 hpi) foi significativamente maior nos grupos de 8, 10 e 16 horas (60,44%, 58,33% e 63,68%, respectivamente), em comparação com os grupos de 2, 4 e 6 horas, que apresentaram valores progressivamente crescentes de 12,66%, 24,46% e 39,30%, respectivamente.

Em relação às taxas de blastocistos (168 hpi), taxas semelhantes foram encontradas entre os grupos de 6, 8, 10 e 16 horas, sendo de 23,58%, 31,56%, 28,51% e 28,25%. Por outro lado, os grupos de 2 e 4 horas apresentaram taxas mais baixas (0% e 6,01%, respectivamente), refletindo a limitação do uso de períodos de FIV de 2 ou 4 horas. Estes resultados demonstram que o período mínimo de 8 horas de interação entre espermatozoides e oócitos na etapa de FIV é necessário para obter taxas adequadas de desenvolvimento embrionário *in vitro*.

**Tabela 5.** Média e erro padrão da média (EPM) das taxas de desenvolvimento embrionário de acordo com os tempos de interação de 2, 4, 6, 8, 10 e 16 horas no Experimento 1.

Grupos experimentais	N. total de oócitos	Primeira clivagem (28 hpi)		Clivagem (96 hpi)		Blastocisto (168 hpi)	
		N. da 1 <sup>a</sup> Clivagem	Taxa de 1 <sup>a</sup> clivagem	N. de embriões clivados	Taxa de clivagem	N. de blastocisto	Taxa de blastocisto
2 h	237	18	7,59% <sup>c</sup>	30	12,66% <sup>d</sup>	0	0% <sup>c</sup>
4 h	233	38	16,31% <sup>b</sup>	57	24,46% <sup>c</sup>	14	6,01% <sup>b</sup>
6 h	229	66	28,82% <sup>a</sup>	90	39,30% <sup>b</sup>	54	23,58% <sup>a</sup>
8 h	225	75	33,33% <sup>a</sup>	136	60,44% <sup>a</sup>	71	31,56% <sup>a</sup>
10 h	228	75	32,89% <sup>a</sup>	133	58,33% <sup>a</sup>	65	28,51% <sup>a</sup>
16 h	223	69	30,94% <sup>a</sup>	142	63,68% <sup>a</sup>	63	28,25% <sup>a</sup>

Legenda: Os dados são expressos em porcentagem (%). A razão entre as estruturas clivadas ou blastocistos e o número total de estruturas (n/N) é mostrada ao lado de cada valor médio. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,05).

A classificação morfológica do estágio dos blastocistos às 168 hpi indicou uma maior proporção de blastocistos expandidos nos grupos de 6 horas (38,89%), 8 horas (33,80%) e 10 horas (30,77%). A diferença foi estatisticamente significativa ( $P=0,0096$ ) entre os grupos de 8 e 16 horas, cuja porcentagem de blastocistos expandidos foi de 14,29%. A taxa blastocistos eclodidos foi nula em todos os grupos, exceto nos grupos de 6 horas (1,85%) e 8 horas (2,82%) (**Tabela 6**).

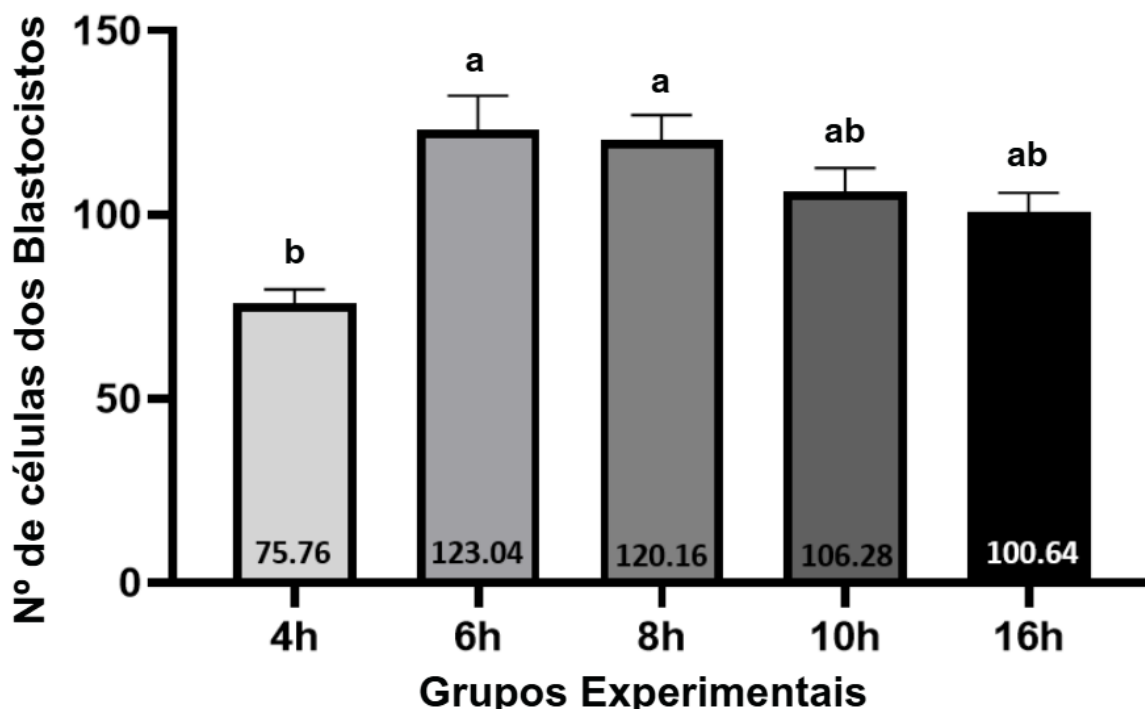
**Tabela 6.** Média e erro padrão da média (EPM) da classificação do estágio de blastocistos no dia 7 (168 hpi) de cultivo em resposta a diferentes tempos de interação entre gametas (4, 6, 8, 10 e 16 horas) no Experimento 1.

<b>Grupos experimentais</b>	<b>Nº de blastocistos</b>	<b>Blastocistos iniciais (%)</b>	<b>Blastocistos típicos(%)</b>	<b>Blastocistos expandidos (%)</b>	<b>Blastocistos eclodidos (%)</b>
4 h	14	92,86 <sup>a</sup> (13/14)	0,00 <sup>b</sup> (0/14)	7,14 <sup>b</sup> (1/14)	0,00 <sup>b</sup> (0/14)
6 h	54	40,74 <sup>b</sup> (22/54)	20,37 <sup>a</sup> (11/54)	38,89 <sup>a</sup> (21/54)	1,85 <sup>a</sup> (1/54)
8 h	71	36,62 <sup>b</sup> (26/71)	28,17 <sup>a</sup> (20/71)	33,80 <sup>a</sup> (24/71)	2,82 <sup>a</sup> (2/71)
10 h	65	44,62 <sup>b</sup> (29/65)	20,37 <sup>a</sup> (13/65)	30,77 <sup>ab</sup> (20/65)	0,00 <sup>b</sup> (0/65)
16 h	63	52,38 <sup>b</sup> (33/63)	33,33 <sup>a</sup> (21/63)	14,29 <sup>b</sup> (9/63)	0,00 <sup>b</sup> (0/63)

Legenda: O tempo de interação de 2 horas não foi apresentado, pois não resultou na formação de blastocistos. Os dados são expressos como porcentagem (%) de embriões em cada estágio de desenvolvimento. A razão entre blastocistos em cada estágio de desenvolvimento e o número total de blastocistos avaliados (n/N) é mostrada ao lado de cada valor médio. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

Em relação ao número total de células, a análise revelou uma diferença significativa entre os diferentes grupos de tempo de FIV ( $P=0,0006$ ). Nesse sentido, os embriões dos grupos de 6 horas ( $123,04^a \pm 9,22$ ) e 8 horas ( $120,16^a \pm 6,95$ ) apresentaram um número maior de células em comparação com o grupo de 4 horas ( $75,76^b \pm 3,92$ ). Os blastocistos dos grupos de 10 horas ( $106,28^{ab} \pm 6,44$ ) e 16 horas ( $100,64^{ab} \pm 5,28$ ) apresentaram número intermediário de células, semelhante aos grupos de 4, 6 e 8 horas (**Figura 2**). Considerando que o período mínimo de 8 horas de FIV é necessário para taxas de desenvolvimento adequadas, e que o período mínimo de 6 horas é necessário para obter maior proporção de blastocistos expandidos e embriões com maior número de células, o período de 8 horas foi selecionado como o período curto de FIV a ser comparado ao período convencional de 16 horas de FIV no Experimento 2.

**Figura 2.** Média e erro padrão da média do número total de células em blastocistos de acordo com os tempos de interação entre espermatozoides e oócitos na etapa de fecundação *in vitro* de 4 h, 6 h, 8 h, 10 h e 16 h.



Legenda: O tempo de interação de 2 horas não resultou na formação de blastocistos às 168 hpi. Letras diferentes indicam diferença estatística.

### **5.3.3. A FIV de curta duração mantém a cinética do desenvolvimento embrionário em comparação com a FIV controle.**

O período curto de FIV de 8 horas (Shrt/IVF) foi comparado ao período convencional de FIV de 16 horas (Ctrl/IVF) em relação às taxas de fecundação e polispermia, competência de desenvolvimento, qualidade embrionária e expressão gênica. Em relação à dinâmica do desenvolvimento inicial, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (**Tabela 7**). Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos para a proporção de embriões que atingiram a primeira clivagem, às 28 hpi ( $P = 0,68$ ), nem para a taxa de clivagem às 96 hpi ( $P = 0,64$ ). Da mesma forma, as taxas de blastocistos, às 168 hpi, não diferiu entre os grupos de FIV curta e FIV convencional ( $P = 0,77$ ).

**Tabela 7.** Média e erro padrão da média (EPM) das taxas de desenvolvimento embrionário obtidas após o período de fecundação *in vitro* curto de 8 horas (Shrt/IVF) e de condição controle de 16 horas (Ctrl/IVF) do Experimento 2.

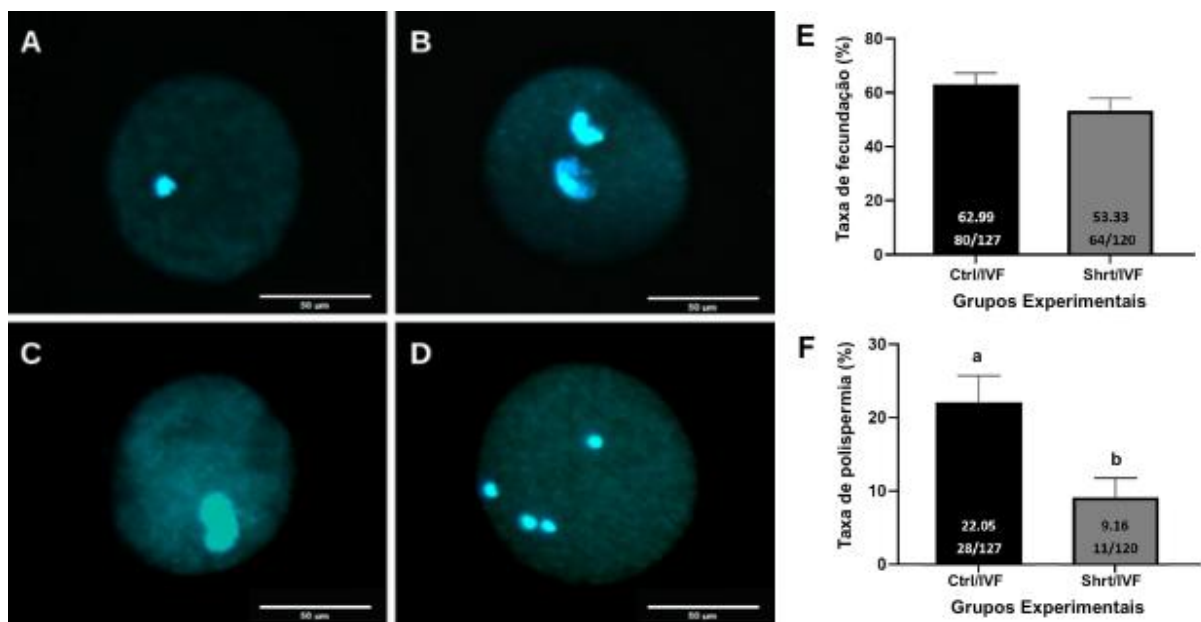
Grupos experimentais	Número total de oócitos	Primeira clivagem (28 hpi)		Clivagem (96 hpi)		Blastocisto (168 hpi)	
		N. da 1 <sup>a</sup> Clivagem	Taxa de 1 <sup>a</sup> clivagem	N. de embriões em clivagem	Taxa de clivagem	N. de blastocisto	Taxa de blastocisto
<b>Shrt/IVF</b>	594	209	35,13% ± 2,89	294	57,73% ± 2,54	67	28,69% ± 4,16
<b>Ctrl/IVF</b>	593	201	33,87% ± 2,64	307	59,05% ± 3,41	64	26,59% ± 3,75

Legenda: Os dados são expressos em porcentagem (%). A razão entre o número de estruturas clivadas ou blastocistos e o número total de estruturas (n/N) é mostrada ao lado de cada valor médio. Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística (P < 0,05).

### 5.3.4. O período de FIV de 8 horas reduziu a polispermia e a produção de EROs no zigotos enquanto a FIV de 16 horas diminuiu os níveis de antioxidante nos embriões de duas células.

Embora a taxa de fecundação tenha sido semelhante ( $P = 0,1586$ ) entre Shrt/IVF ( $53,33 \pm 4,54\%$ ) e Ctrl/IVF ( $62,99 \pm 4,28\%$ ), a taxa de polispermia foi significativamente menor ( $P = 0,0065$ ) nos zigotos de Shrt/IVF ( $9,16^b \pm 2,63\%$ ) em comparação com Ctrl/IVF ( $22,05^a \pm 3,68\%$ ) (**Figura 3**).

**Figura 3.** Avaliação das taxas de fecundação e polispermia de embriões advindos de período de fecundação *in vitro* curta de 8 horas (Shrt/IVF) e de condição controle de 16 horas (Ctrl/IVF) no Experimento 2.

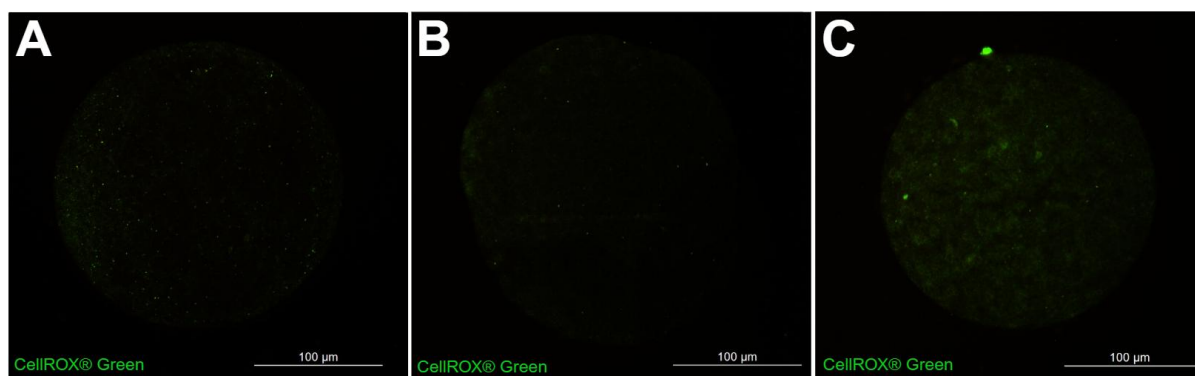


Legenda: Imagens representativas de microscopia de fluorescência de zigoto não fecundado em **A** (PN = 1), zigoto fecundado (PN = 2) em **B** e **C**, e zigoto polispérmico (PN > 2) em **D**. Barra de escala: 50 µm. Em **E**, média e erro padrão da média da taxa de fecundação. Em **F**, média e erro padrão da média da taxa de polispermia. Letras diferentes indicam diferença estatística.

Além disso, os zigotos também foram avaliados quanto à produção de EROs por meio da detecção dos níveis de intracelulares. Nesse sentido, os zigotos do grupo Shrt/IVF avaliados ao final da FIV (Shrt/IVF-8h) e avaliados 8 horas após o término da

FIV (Shrt/IVF-16h) apresentaram menor produção de EROs ( $P = 0,0017$ ) em comparação aos zigotos do grupo Ctrl/IVF (**Tabela 8; Figura 4**).

**Figura 4.** Avaliação da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) em zigotos produzidos por período de fecundação *in vitro* curto de 8 horas (Shrt/IVF) e condição controle de 16 horas (Ctrl/IVF) no Experimento 2.



Legenda: Imagens representativas de microscopia de fluorescência de zigotos de Shrt/IVF-8h em **A**, Shrt/IVF-16h em **B** e **C** Ctrl/IVF-16h em CellROX Green foi usado para avaliar a produção de EROs. O controle negativo foi incluído em todas as avaliações. Barra de escala: 100 µm.

**Tabela 8.** Intensidade de fluorescência mediana, mínima e máxima dos níveis de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) intracelulares em zigotos obtidos dos grupos Shrt/IVF-8 h, Shrt/IVF-16 h e Ctrl/IVF-16 h.

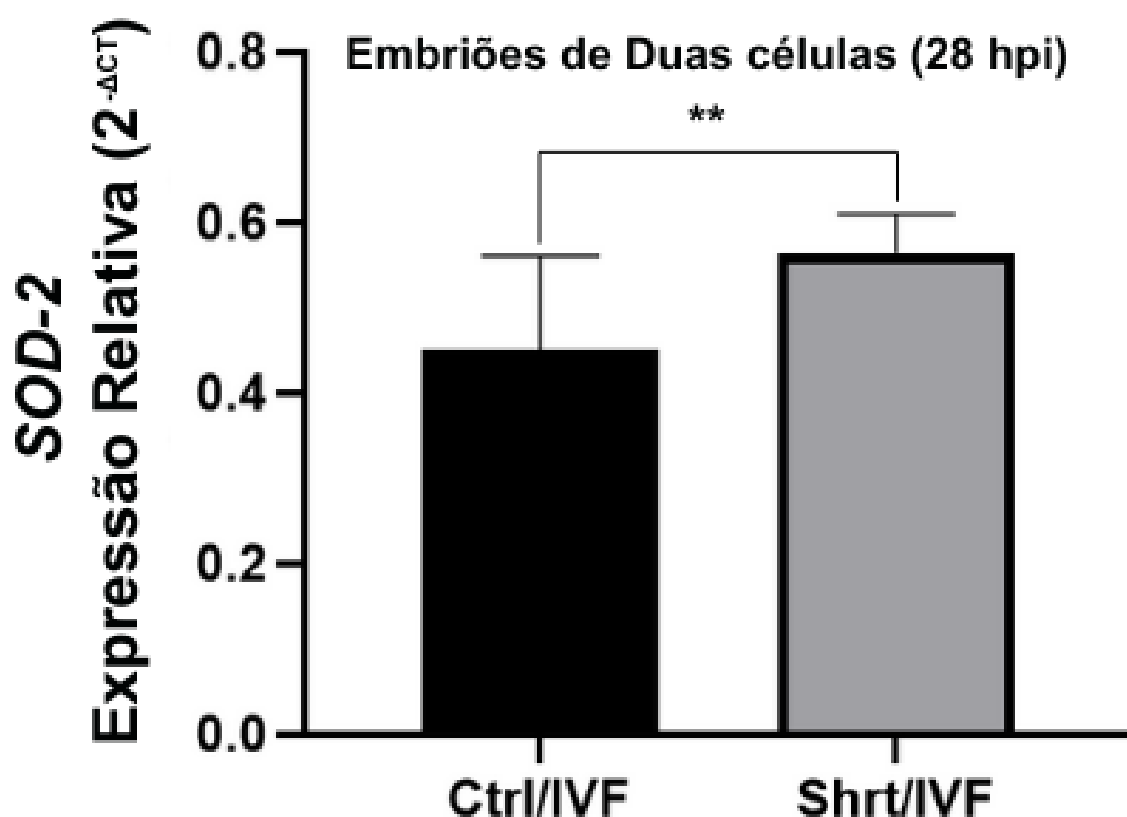
Grupos experimentais	Mediana	Mínimo	Máximo
Shrt/IVF-8h	0,220 <sup>b</sup>	0,000	67,829
Shrt/IVF-16h	0,200 <sup>b</sup>	0,010	59,484
Ctrl/IVF-16h	8,260 <sup>a</sup>	0,004	79,830

Legenda: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

Os níveis do transcrito de SOD-2 apresentou uma tendência para a menor abundância em embriões de duas células derivados do grupo Ctrl/IVF (**Figura 5**) em comparação ao grupo Shrt/IVF ( $0,452 \pm 0,045$  vs.  $0,525 \pm 0,043$ ;  $p = 0,074$ ). Todos esses resultados reforçam a hipótese de que uma FIV prolongada aumenta a fecundação polispérmica e a produção de EROs no embrião de forma a consumir mais

agentes antioxidantes, sugerindo que um período de FIV mais curto pode favorecer a qualidade do embrião já nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário.

**Figura 5.** Níveis de abundância do transcrito de SOD-2 em embriões de dois blastômeros (28 hpi) do grupo Short/IVF (8 h) e do grupo Ctrl/IVF (16 h) no Experimento 2.



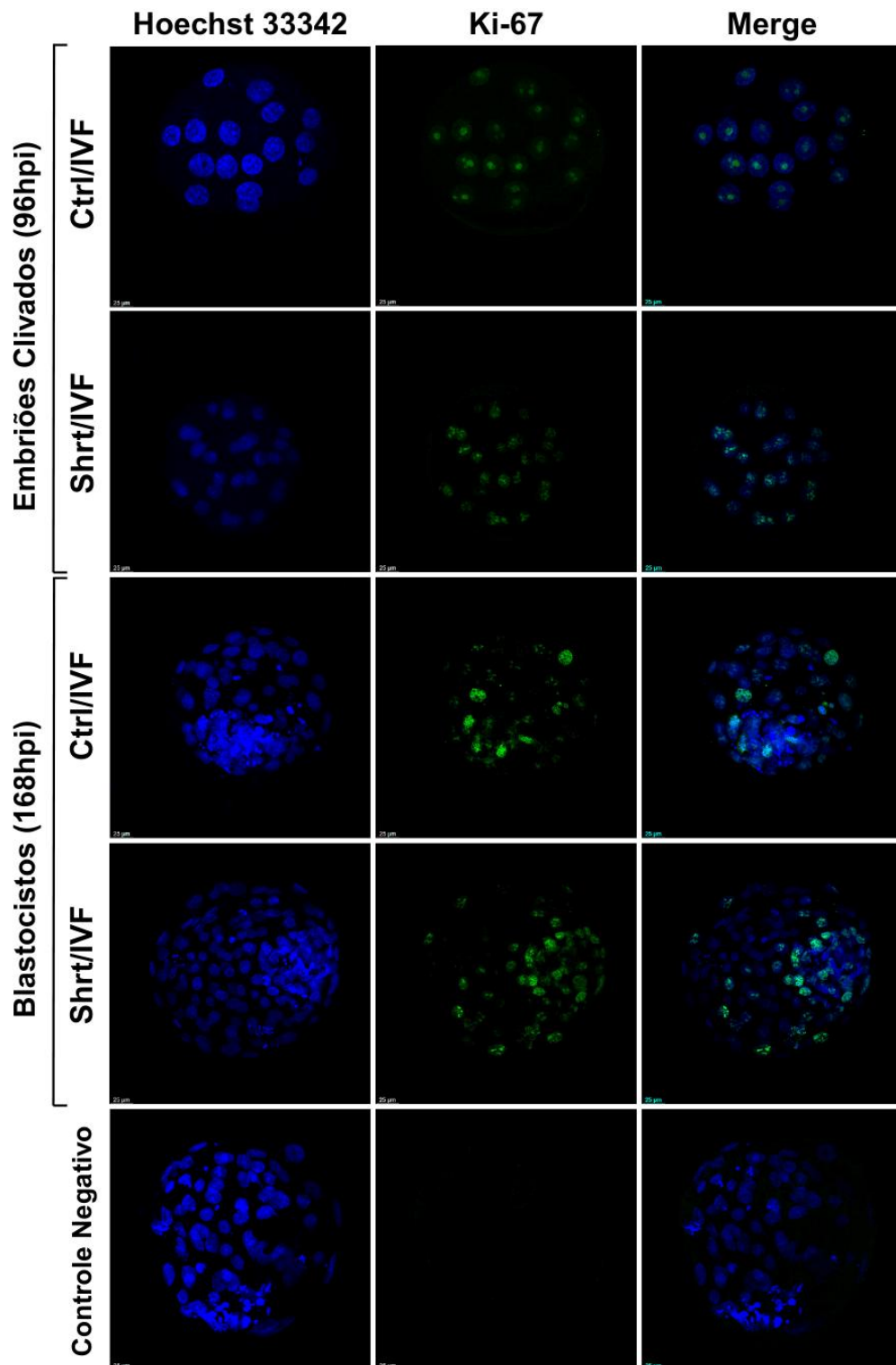
Legenda: Os dados são apresentados como nível de expressão gênica ( $2^{-\Delta CT}$ ) em relação aos genes endógenos ACTB, PPIA e RPL15, e são apresentados como média e erro padrão da média. \*\*Os asteriscos indicam tendência estatística.

### 5.3.5. A taxa de proliferação de embriões em clivagem não difere entre a FIV curta e a FIV controle.

A taxa de proliferação foi comparada por imunofluorescência entre embriões clivados (96 hpi) dos grupos Shrt/IVF e Ctrl/IVF (**Figura 6** e **Figura 7**). Os embriões do grupo Shrt/IVF apresentaram número de células semelhante ao dos embriões do

grupo Ctrl/IVF (Ctrl/IVF:  $15,27 \pm 2,08$ ; Shrt/IVF:  $18,00 \pm 1,99$ ;  $P = 0,2476$ ), assim como a proliferação celular (Ctrl/IVF:  $46,50 \pm 11,00\%$ ; Shrt/IVF:  $43,10 \pm 11,50\%$ ;  $P = 0,3474$ ), e número de divisões celulares (Ctrl/IVF:  $3,82 \pm 0,18$ ; Shrt/IVF:  $4,07 \pm 0,16$ ;  $P = 0,304$ ). Análises moleculares confirmaram ainda mais esse resultado, mostrando que, nos estágios de duas células e clivadas, a expressão de genes relacionados à proliferação celular (KRAS e PCNA) não diferiu significativamente.

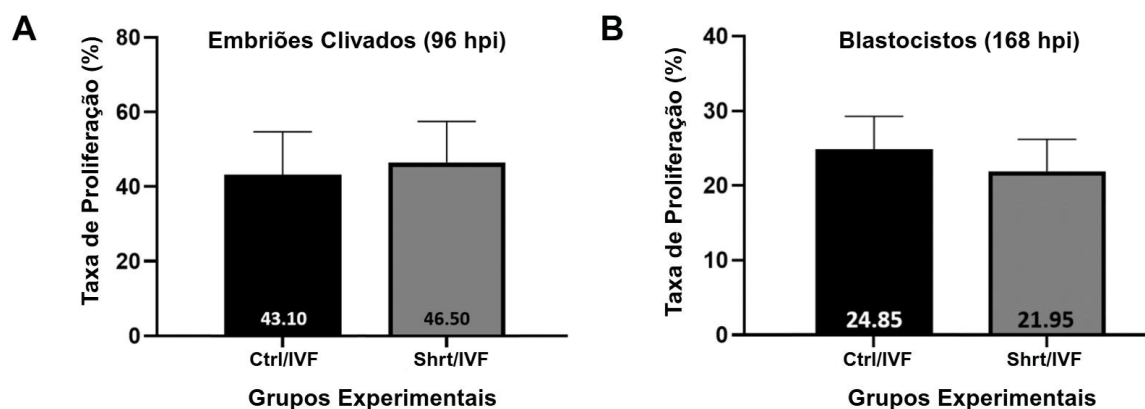
**Figura 6.** Imagens de imunomarcção de Ki-67 em embriões de Shrt/IVF (8 h) e Ctrl/IVF (16 h) no Experimento 2.



Legenda: Microscopia confocal representativa. Imagens de microscopia de embriões no dia 4 (96 hpi) e no dia 7 (168 hpi). A coloração nuclear foi realizada com Hoechst.33342 para identificar o número total de células, e a imunofluorescência de

Ki-67 marca as células proliferativas. Imagens de controle negativo foram incluídas para confirmar a especificidade da imunofluorescência. Barra de escala: 25  $\mu$ m.

**Figura 7.** Avaliação da taxa de proliferação em embriões clivados no Dia 4 (96 hpi) e em blastocistos no Dia 7 (168 hpi) dos grupos Shrt/IVF (8 h) e Ctrl/IVF (16 h) no Experimento 2.

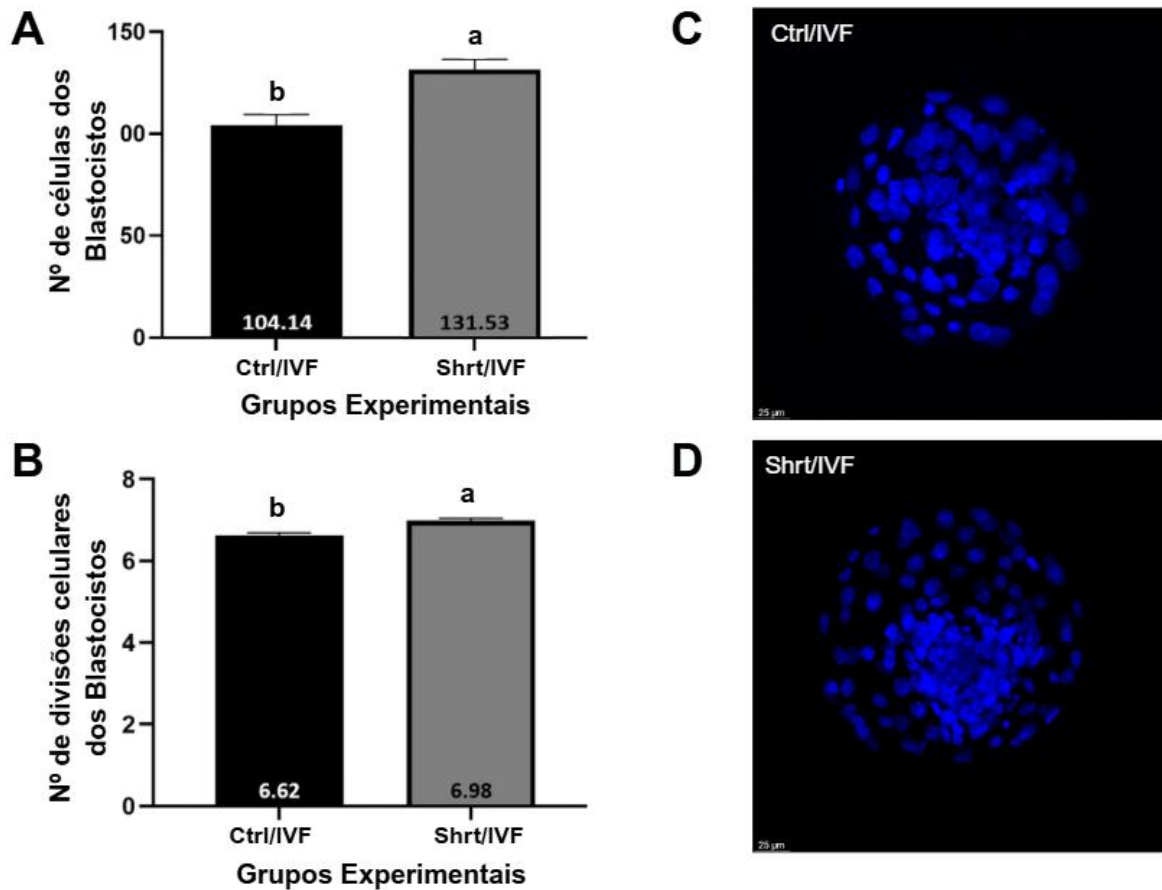


Legenda: Média e erro padrão da média (SEM) da taxa de proliferação (porcentagem de células Ki-67-positivas) em embriões clivados em A e em blastocistos em B.

### 5.3.6. O número de células em blastocistos produzidos com 8 horas de FIV é maior do que produzidos com 16 horas de FIV, bem como número de divisões celulares.

Embora os blastocistos do grupo Shrt/IVF ( $21,95 \pm 4,25\%$ ) apresentassem uma taxa de proliferação semelhante ( $P = 0,6846$ ) à do grupo Ctrl/IVF ( $24,85 \pm 4,42\%$ ) (**Figura 7**), os blastocistos do grupo Shrt/IVF ( $144,69 \pm 9,85$ ) demonstraram um número maior ( $P = 0,000518$ ) de células em comparação com o grupo Ctrl/IVF ( $89,58 \pm 9,47$ ). Para corroborar esses dados, ao considerar os embriões dos Experimentos 1 e 2 ( $n = 51$  para Shrt/IVF e  $n = 49$  para Ctrl/IVF), o número de células foi significativamente maior ( $P = 0,000346$ ) nos blastocistos do grupo Shrt/IVF (**Figura 8**). Em relação ao número de divisões celulares, também foi observada diferença estatística, sendo maior ( $P = 0,000225$ ) no grupo Shrt/IVF ( $6,98^a \pm 0,06$ ) quando comparado ao grupo Ctrl/IVF ( $6,62^b \pm 0,07$ ) (**Figura 8**).

**Figura 8.** Avaliação do número de células e da divisão celular em blastocistos no Dia 7 (168 hpi) do protocolo Shrt/IVF (8 h) e do protocolo Ctrl/IVF (16 h) no Experimento 2.



Legenda: Média e erro padrão da média do número de células em **A** e número de divisões celulares em **B**. Imagens representativas de microscopia confocal de blastocistos de Ctrl/IVF em **C** e Shrt/IVF em **D**. Letras diferentes indicam uma diferença estatística altamente significativa entre os grupos ( $P < 0,05$ ). Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ .

#### 5.4. Discussão

O presente estudo demonstra de forma consistente que a redução do tempo de coincubação espermatozoide–oócito para 8 horas é não apenas suficiente para assegurar a fecundação bem-sucedida, como também promove melhorias significativas na qualidade embrionária em comparação com o protocolo convencional de 16 horas. Esses achados posicionam o tempo de interação gamética como um modulador crítico da competência embrionária, expandindo interpretações anteriores que já questionavam a necessidade de exposição prolongada dos gametas (KOCHHAR et al., 2003; BERLAND et al., 2011). Inicialmente, a padronização das amostras espermáticas utilizadas no estudo assegurou que os efeitos observados fossem atribuídos ao tempo de coincubação, minimizando a influência da variabilidade seminal. Os parâmetros de qualidade e desenvolvimento embrionário mantiveram-se dentro dos padrões esperados para sistemas comerciais de PIVE, o que reforça a robustez experimental e a aplicabilidade dos resultados.

A avaliação de múltiplos intervalos de coincubação permitiu identificar que períodos inferiores a 6 horas comprometeram significativamente as taxas de clivagem, enquanto 8 horas se mostraram suficientes para sustentar o desenvolvimento embrionário adequado. Embora a estabilização das taxas de fecundação nesse intervalo já tenha sido sugerida (SATTAR et al., 2011), as evidências aqui obtidas avançam ao demonstrar que esse tempo também está associado à manutenção da qualidade embrionária. Esse padrão é consistente com a dinâmica temporal dos eventos iniciais da fecundação, nos quais a formação pronuclear ocorre nas primeiras horas após a inseminação (LAURINCIK et al., 1998), indicando que o prolongamento da coincubação além desse período não confere benefícios adicionais e pode comprometer o desenvolvimento embrionário subsequente.

A menor incidência de polispermia observada no grupo submetido à FIV de curta duração representa um dos achados mais relevantes, indicando que a limitação do tempo de exposição aos espermatozoides preserva os mecanismos de bloqueio à penetração múltipla. Evidências prévias associam a falha desses mecanismos ao desarranjo dos grânulos corticais em condições de estresse oxidativo (SAKATANI et al., 2015) e ao envelhecimento oocitário em casos de fecundação tardia (CHIAN et al.,

1992). Nesse sentido, os resultados indicam que a modulação do tempo de coincubação é suficiente para mitigar tais efeitos dentro do sistema *in vitro*.

De forma complementar, o maior acúmulo de EROs observado no grupo de 16 horas evidencia que a interação prolongada dos gametas favorece um ambiente oxidativo desfavorável. Sabe-se que espermatozoides incubados por longos períodos mantêm elevada atividade metabólica, intensificando a produção de espécies reativas de oxigênio, principalmente por vias mitocondriais (KOPPERS et al., 2008). Além disso, a presença de espermatozoides mortos contribui significativamente para esse acúmulo (BALL & BAUMBER, 2001), e a ausência dos sistemas antioxidantes do trato reprodutivo feminino no ambiente *in vitro* agrava esse desequilíbrio (AITKEN & DREVET, 2020). Neste sentido, a redução do tempo de coincubação, portanto, emerge como uma estratégia eficaz para limitar o acúmulo de EROs, minimizando o estresse oxidativo durante a fecundação. Alterações no estado redox refletem-se diretamente na qualidade embrionária. Embriões oriundos de condições com maior estresse oxidativo tendem a apresentar maior comprometimento celular, associado a danos no DNA e falhas na ativação oocitária (SIMÕES et al., 2013). Esse aspecto é particularmente relevante, uma vez que os estágios iniciais do desenvolvimento, especialmente zigoto e duas células, são altamente sensíveis aos efeitos deletérios das EROs (Morales et al., 1999). Assim, os menores níveis de estresse oxidativo observados nesses estágios iniciais podem contribuir diretamente para a melhoria da competência embrionária subsequente.

Em contraste, embriões provenientes da FIV de curta duração apresentaram indícios de maior eficiência antioxidante, evidenciados pela tendência de maior expressão de SOD-2 nos estágios iniciais. A superóxido dismutase 2 (SOD-2) é uma enzima antioxidante localizada na matriz mitocondrial, que desempenha um papel central no controle do estresse oxidativo e na integridade mitocondrial, convertendo  $O_2^-$  em  $H_2O_2$ , que posteriormente será convertido em  $H_2O$  e  $O_2$  pelas enzimas catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) (JOMOVA et al., 2024). Sua maior expressão indica uma resposta antioxidante mais eficaz no grupo de FIV de curta duração contra os radicais superóxido ( $O_2^-$ ) que podem ser produzidos pelos espermatozoides, contribuindo para a estabilidade redox durante as clivagens iniciais. Estudos anteriores relataram que o aumento da expressão de SOD-2 está associado

a maior qualidade embrionária, maior contagem celular, menor apoptose e níveis reduzidos de EROs em embriões bovinos, tanto sob suplementação de antioxidantes quanto em condições de cultivo com baixo teor de oxigênio, o que aumenta a indução de genes antioxidantes e a competência mitocondrial (PIOLTINE, 2020; CHEN et al., 2022; BAEZ et al. 2024). Morales et al. (1999) demonstraram que zigotos bovinos são mais sensíveis aos efeitos deletérios do  $H_2O_2$ , como fragmentação de DNA e lise celular, quando comparados a embriões em estágios mais avançados, caracterizando os estágios de zigoto e duas células como períodos críticos de elevada susceptibilidade ao estresse oxidativo.

Como consequência integrada desses mecanismos, observou-se maior número de células nos blastocistos oriundos da FIV de curta duração, um dos principais indicadores de qualidade embrionária. Esse resultado sugere maior sincronização das clivagens iniciais, menor incidência de anormalidades cromossômicas e melhor preservação da função mitocondrial. A ausência de diferenças na capacidade proliferativa indica que esse benefício está associado à eficiência das divisões iniciais, e não a um aumento na taxa mitótica. Do ponto de vista funcional, esses achados possuem implicações diretas no potencial de desenvolvimento pós-transferência. Blastocistos com maior número de células tendem a apresentar maior capacidade de produção de interferon tau (IFNT), essencial para o reconhecimento materno da gestação (FORDE & LONERGAN, 2017), cuja secreção está diretamente relacionada à massa celular do trofotoderma (ANTONIAZZI et al., 2011). Esse raciocínio é sustentado por evidências que associam maior expressão de ISG15 em fêmeas gestantes a uma melhor competência embrionária (MATSUYAMA et al., 2012).

Os resultados deste estudo demonstram que a redução do tempo de coincubação gamética mantém a eficiência da fecundação e melhora parâmetros relevantes da qualidade embrionária, incluindo menor incidência de polispermia, menor acúmulo de EROs e maior número de células nos blastocistos. Esses achados indicam que os protocolos convencionais de FIV podem ser ajustados com base em critérios fisiológicos mais alinhados à dinâmica da fecundação. Nesse sentido, a utilização de tempos reduzidos de coincubação pode ser incorporada às rotinas laboratoriais como uma estratégia de refinamento dos sistemas de PIVE, com

potencial para aumentar a eficiência dos processos, melhorar a qualidade embrionária e ampliar a janela funcional da fecundação, permitindo maior flexibilidade e adaptação no planejamento de laboratórios comerciais.

## **6. Conclusões**

O presente estudo demonstrou que a redução do tempo de interação entre gametas influencia no desenvolvimento embrionário. A identificação de 8 horas como o menor período capaz de preservar as taxas de desenvolvimento e a qualidade embrionária sugere que os protocolos convencionais de FIV, a partir de 16 horas, podem ultrapassar o intervalo necessário para fecundação. A preservação das taxas de fecundação, associada à redução da polispermia e a menores níveis de espécies reativas de oxigênio nos zigotos, bem como a uma maior competência antioxidante nos embriões de duas células, sugerem condições iniciais mais favoráveis ao desenvolvimento embrionário. De forma consistente, o maior número total de células observado nos embriões oriundos da FIV curta reforça que a limitação controlada da interação entre gametas favorece a qualidade embrionária sem comprometer a eficiência da biotécnica.

## 7. Considerações finais

Os resultados e discussões apresentados nesta dissertação reforçam a premissa de que a fecundação *in vitro* constitui um período crítico para a determinação da qualidade embrionária, particularmente nas horas iniciais após a deposição dos espermatozoides no meio de fecundação. A hipótese central do estudo, de que os principais eventos da fecundação são concluídos nas primeiras horas de interação espermatozoide-oócito e que a exposição prolongada dos gametas em sistema *in vitro* pode comprometer a qualidade embrionária, mostrou-se biologicamente consistente à luz das evidências teóricas e experimentais discutidas.

No Capítulo 1, a revisão da literatura evidenciou que a fecundação, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, apresenta uma dinâmica temporal bem definida, na qual os eventos críticos da interação gamética ocorrem logo após a inseminação. Esse capítulo discutiu de forma comparativa como as modulações reguladas fisiologicamente no TRF e como essa regulação é parcialmente perdida nos sistemas *in vitro*. Além disso, foram abordados os principais fatores que podem influenciar durante a FIV, incluindo o tipo de sêmen, método de seleção dos espermatozoides, composição do meio de cultivo. O capítulo também apresentou um apanhado crítico de estudos que empregaram diferentes tempos de FIV em mamíferos não humanos, destacando a ampla variação de protocolos e a ausência de um consenso fisiologicamente fundamentado quanto à duração ideal da interação gamética.

No Capítulo 2, o estudo experimental avançou a partir dessa base conceitual ao investigar, de forma integrada, a influência do tempo de interação espermatozoide-oócito sobre a cinética de desenvolvimento embrionário e a qualidade embrionária em sistema de produção *in vitro* de embriões bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*). Os resultados permitiram avaliar não apenas parâmetros de desenvolvimento até o estágio de blastocisto, mas também eventos associados à fecundação e ao período pós-fecundação imediato, incluindo a ocorrência de polispermia, alterações no ambiente oxidativo inicial e aspectos relacionados à modulação transcricional embrionária. Esses achados indicam que a redução controlada do tempo de

coincubação gamética é compatível com a fecundação efetiva e pode favorecer um ambiente mais adequado ao desenvolvimento embrionário pré-implantacional.

De forma integrada, os dados apresentados nesta dissertação indicam que a modulação do tempo de interação espermatozoide-oócito constitui uma estratégia relevante para o refinamento dos protocolos de FIV em bovinos. A adequação desse período às exigências fisiológicas da fecundação, considerando o conhecimento oriundo de estudos *in vivo* e *in vitro* em diferentes espécies de mamíferos, pode contribuir para a melhoria da qualidade embrionária e para o aumento da eficiência dos sistemas de produção *in vitro* de embriões. Assim, o presente trabalho reforça a importância de abordagens que priorizem não apenas a ocorrência da fecundação, mas também a qualidade biológica do embrião recém gerado, alinhando os protocolos de FIV aos princípios fundamentais da fisiologia reprodutiva.

## 8. Referências

ABIEC - Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Beef Report 2025**. Perfil da Pecuária no Brasil. [S.l.: S.n.]. Disponível em: <<https://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2025-perfil-da-pecuaria-no-brasil/>>.

Acesso em: 22 de jan de 2026.

Abreu LA, Paula VR, Carvalho BC, Souza AH, Rebeis LM, Mori FK, Gricio E, Baruselli PS. Influência do intervalo entre partos na pegada de carbono de vacas leiteiras em lactação sob a métrica de avaliação do ciclo de vida. **Animal Science Proceedings**. 2023;14(3):529-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anscip.2023.03.159>

AITKEN, John; BUCKINGHAM, Donna; KRAUSZ, Csilla. Relações entre marcadores bioquímicos para citoplasma espermático residual, geração de espécies reativas de oxigênio e a presença de leucócitos e células germinativas precursoras em suspensões de espermatozoides humanos. **Reprodução e desenvolvimento molecular**, v. 39, n. 3, p. 268-279, 1994.

AITKEN, R. John et al. Análise das relações entre estresse oxidativo, danos ao DNA e vitalidade espermática em uma população de pacientes: desenvolvimento de critérios diagnósticos. **Human Reproduction** , v. 25, n. 10, p. 2415-2426, 2010.

AITKEN, R. John; BAKER, Mark A. Estresse oxidativo, sobrevivência espermática e controle da fertilidade. **Endocrinologia molecular e celular** , v. 250, n. 1-2, p. 66-69, 2006.

AITKEN, R. John; CLARKSON, Jane S. Significance of reactive oxygen species and antioxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. **Journal of andrology**, v. 9, n. 6, p. 367-376, 1988.

AITKEN, RJ (2017). Espécies reativas de oxigênio como mediadoras da capacitação espermática e danos patológicos. **Reprodução e Desenvolvimento Molecular**, 84(10), 1039–1052. <https://doi.org/10.1002/mrd.22871>.

AITKEN, RJ, & DREVET, JR (2020). A importância do estresse oxidativo na determinação da funcionalidade dos espermatozoides de mamíferos: uma faca de dois gumes. **Antioxidants**, 9(2), 111. <https://doi.org/10.3390/antiox9020111>

ALEXANDRATOS, Nikos; BRUINSMA, Jelle. Agricultura mundial rumo a 2030/2050: a revisão de 2012. 2012.

ALMEIDA, Jaci et al. Impacto da fertilização in vitro com sêmen de búfalo refrigerado versus congelado na competência de desenvolvimento de embriões de búfalo. **Animal Reproduction**, v. 17, n. 4, p. e20200033, 2020.

ALMINANA, C. et al. In vitro fertilization (IVF) in straws and a short gamete coincubation time improves the efficiency of porcine IVF. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. 6, p. 747-752, 2008.

ALVES, MBR, ARRUDA, RP, DE BEM, THC, FLOREZ-RODRIGUEZ, SA, FILHO, MF DE S., BELLEANNÉE, C., MEIRELLES, FV, DA SILVEIRA, JC, PERECIN, F., & CARVALHO, C. (2019). O miR-216b transmitido por esperma modula a proliferação celular durante o desenvolvimento inicial do embrião via K-RAS. **Scientific Reports**, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-46775-8>

AMARAL, A., LOURENÇO, B., MARQUES, M., & RAMALHO-SANTOS, J. (2013). Funcionalidade das mitocôndrias e qualidade do esperma. **Reprodução**, 146(5), R163-174. <https://doi.org/10.1530/REP-13-0178>

ANTONIAZZI, AQ, HENKES, LE, OLIVEIRA, JFC E HANSEN, TR (2011). Papel do interferon-ftau durante o reconhecimento materno da gravidez em ruminantes. **Rural Science**, 41, 176–185. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000100029>.

ANZALONE, DA, PALAZZESE, L., CZERNIK, M., SABATUCCI, A., VALBONETTI, L., CAPRA, E., & LOI, P. (2021). A interação controlada espermatozóide-ovócito melhora a qualidade do embrião em ovelhas. **Scientific Reports**, 11(1), 22629. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02000-z>

ARMON, Leah; EISENBACH, Michael. Mecanismo comportamental durante a quimiotaxia de espermatozoides humanos: envolvimento da hiperativação. **PloS one** , v. 6, n. 12, p. e28359, 2011.

ASGHAR, Waseem et al. Seleção de espermatozoides humanos funcionais com maior integridade do DNA e menor produção de espécies reativas de oxigênio. **Advanced healthcare materials** , v. 3, n. 10, p. 1671-1679, 2014.

ASHWOOD-SMITH, MJ, & EDWARDS, RG (1996). Genética e concepção humana. **Reprodução Humana Molecular**, 2(1), 46–51. <https://doi.org/10.1093/molehr/2.1.46>

BÁEZ, F., DE BRUN, V., RODRÍGUEZ-OSORIO, N., & VIÑALES, C. (2024). Baixa tensão de oxigênio durante a produção de embriões in vitro melhora o rendimento, a qualidade e a criotolerância de blastocistos bovinos. **Animal Science Journal**, 95(1), e13941.

BALASURIYA, A. et al. Processes involved in assisted reproduction technologies significantly increase sperm DNA fragmentation and phosphatidylserine translocation. **Andrologia**, v. 46, n. 2, p. 86-97, 2014.

BALL, Barry A.; VO, Anthony T.; BAUMBER, Julie. Geração de espécies reativas de oxigênio por espermatozoides equinos. **American journal of veterinary research** , v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.

BERGQVIST, Ann-Sofi et al. Capacitação in vitro de espermatozoides de touro pelo fluido ovidutal e seus componentes. **Zygote** , v. 14, n. 3, p. 259-273, 2006a

BERGQVIST, Ann-Sofi; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, Heriberto. Glicosaminoglicanos sulfatados (S-GAGs) e sindecanos no oviduto bovino. **Animal reproduction science** , v. 93, n. 1-2, p. 46-60, 2006b.

BERLAND, M., FREI, M., PERALTA, O., & RATTO, M. (2011). Período de exposição de oócitos bovinos a espermatozoides em relação à taxa de desenvolvimento e qualidade do embrião. **ISRN Veterinary Science**, 2011, 257627. <https://doi.org/10.5402/2011/257627>

BHAKTA, HH, REFAI, FH, & AVELLA, MA (2019). Os mecanismos moleculares que mediam a fertilização em mamíferos. **Desenvolvimento**, 146(15).

BIANCHI, Enrica et al. Juno é o receptor Izumo do óvulo e é essencial para a fertilização em mamíferos. **Nature** , v. 508, n. 7497, p. 483-487, 2014.

BIFARETTI, Adrián; PAVAN, Enrique; GRIGIONI, Gabriela. Consumer attitudes and concerns about beef consumption in Argentina and other South American countries. **Agriculture**, v. 13, n. 3, p. 560, 2023.

BITTNER, L., WYCK, S., HERRERA, C., SIUDA, M., WRENZYCKI, C., LOON, BC AN, & BOLLWEIN, H. (2018). Efeitos negativos do estresse oxidativo em espermatozoides bovinos no desenvolvimento in vitro e na integridade do DNA de embriões. **Reproduction Fertility and Development**, 30(10), 1359–1359. <https://doi.org/10.1071/rd17533>

BOTTA, D., DE ARRUDA, RP, WATANABE, YF, DE CARVALHO BALIEIRO, JC, ROMANELLO, N., DO NASCIMENTO BARRETO, A., ... & GARCIA, AR (2019). Influência do ambiente térmico pós-descongelamento nas características do espermatozóide bovino e na fertilidade in vitro. **Andrologia**, 51(6), e13266. <https://doi.org/10.1111/and.13266>.

BRENKER, C. et al. Ativação sinérgica dos canais de Ca<sup>2+</sup> CatSper em espermatozoides humanos por ligantes do oviduto e substâncias químicas disruptoras endócrinas. **Human Reproduction** , v. 33, n. 10, p. 1915-1923, 2018.

BURKART, Anna D. et al. Ovastacin, a cortical granule protease, cleaves ZP2 in the zona pellucida to prevent polyspermy. **Journal of Cell Biology**, v. 197, n. 1, p. 37-44, 2012.

CAMARA PIREZ, Miguel et al. As interações entre espermatozoides bovinos e ovidutos são caracterizadas por comportamento espermático específico, ultraestrutura e reações tubárias que são impactadas pela seleção sexual. **Scientific reports** , v. 10, n. 1, p. 16522, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-73592-1>

CASTELLINI, Chiara et al. Relação entre leucocitospermia, potencial reprodutivo após técnicas de reprodução assistida e parâmetros espermáticos: uma revisão sistemática e meta-análise de estudos de caso-controle. **Andrology** , v. 8, n. 1, p. 125-135, 2020.

CHAMBERLAND, A. et al. O efeito da heparina nos parâmetros de motilidade e na fosforilação de proteínas durante a capacitação de espermatozoides bovinos. **Theriogenology** , v. 55, n. 3, p. 823-835, 2001.

CHANG, Haixin; SUAREZ, Susan S. Repensando a relação entre hiperativação e quimiotaxia em espermatozoides de mamíferos. **Biologia da reprodução** , v. 83, n. 4, p. 507-513, 2010.

CHAVES, BR et al. A albumina exógena é crucial para que os espermatozoides suínos induzam a capacitação in vitro, enquanto o bicarbonato apenas modula sua eficiência. **Biology** , v. 10, n. 11, p. 1105, 2021.

CHEN, PH, TJONG, WY, YANG, HC, LIU, HY, STERN, A., & CHIU, DTY (2022). Glicose-6-fosfato desidrogenase, homeostase redox e embriogênese. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(4), 2017.

CHIAN, RC, NAKAHARA, H., NIWA, K., & FUNAHASHI, H. (1992). Fertilização e clivagem precoce in vitro de oócitos bovinos envelhecidos após maturação em cultura. **Theriogenology**, 37(3), 665-672. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90146-I](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90146-I)

COONROD, SA et al. O tratamento de oócitos de camundongo com PI-PLC libera aglomerados de proteínas de 70 kDa (p I 5) e de 35 a 45 kDa (p I 5,5) da superfície do óvulo e inibe a ligação e fusão do espermatozoide com o oolema. **Dev. Biol.** 207 , 334–349 (1999)

CORCORAN, D., FAIR, T., PARK, S., RIZOS, D., PATEL, O. V., SMITH, G. W., ... & LONERGAN, P. (2006). Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. **Reproduction**, 131(4), 651-660.

CORTAT, P R et al. Ligação de espermatozoides às células do oviduto: a influência do meio endócrino na eficácia do teste de ligação. **Theriogenology** , p. 117761, 2025.

COY, P. et al. Papéis do oviduto na fertilização de mamíferos. **Reproduction (Cambridge, Inglaterra)** , v. 144, n. 6, p. 649, 2012.

DALLE PALLE, Enrico; TEKIN, Koray; STELLETTA, Calogero. Nature does it better: mimicking in vivo conditions to resolve in vitro production side effects. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 12, p. 1617740, 2025.

DE CASTRO, LS, DE ASSIS, PM, SIQUEIRA, AFP, HAMILTON, TR, MENDES, CM, LOSANO, JDA, NICHI, M., VISINTIN, JA, & ASSUMPÇÃO, MEOA (2016). O estresse oxidativo do esperma é prejudicial ao desenvolvimento embrionário: um modelo de estudo dose-dependente e uma nova avaliação do estado oxidativo mais sensível. **Medicina Oxidativa e Longevidade Celular** (2016), 1–12. <https://doi.org/10.1155/2016/8213071>.

DE OLIVEIRA CARVALHO, José et al. Flow cytometry sex sorting affects bull sperm longevity and compromises their capacity to bind to oviductal cells. **Livestock Science**, v. 207, p. 30-37, 2018.

DELGADO-BERMÚDEZ, Ariadna et al. Uma revisão sobre o papel dos transportadores de bicarbonato e prótons durante a capacitação espermática em mamíferos. **Revista Internacional de Ciências Moleculares** , v. 23, n. 11, p. 6333, 2022.

DODE, M. A. N. et al. The effect of sperm preparation and co-incubation time on in vitro fertilization of bos indicus oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 69, n. 1-2, p. 15-23, 2002.

DUCIBELLA, T. (1996). A reação cortical e o desenvolvimento da competência de ativação em oócitos de mamíferos. **Human reproduction update**, 2(1), 29-42. <https://doi.org/10.1093/humupd/2.1.29>

EAMER, Lise et al. Avaliação microfluídica de meios de natação para seleção de espermatozoides baseada na motilidade. **Biomicrofluidics** , v. 9, n. 4, 2015. <https://doi.org/10.1063/1.4928129>

EKHLASI-HUNDRIESER, Mahnaz et al. A espermedesina AQN1 é uma molécula receptora candidata envolvida na formação do reservatório de espermatozoides do oviduto em suínos. **Biologia da Reprodução**, v. 73, n. 3, p. 536-545, 2005.

ELLINGTON, Joanna E. et al. Higher-quality human sperm in a sample selectively attach to oviduct (fallopian tube) epithelial cells in vitro. **Fertility and Sterility**, v. 71, n. 5, p. 924-929, 1999.

ENKHMAA, D.; KASAI, T.; HOSHI, Kazuhiko. Long-Time Exposure of Mouse Embryos to the Sperm Produces High Levels of Reactive Oxygen Species in Culture Medium and Relates to Poor Embryo Development. **Reproduction in domestic animals**, v. 44, n. 4, p. 634-637, 2009.

EVANS, JP (2020). Prevenção da polispermia em óvulos de mamíferos — Contribuições do bloqueio da membrana e outros mecanismos. **Reprodução e desenvolvimento molecular**, 87(3), 341-349. <https://doi.org/10.1002/mrd.23331>

FERRÉ, Luis B. et al. Effect of spermatozoa motility hyperactivation factors and gamete coincubation duration on in vitro bovine embryo development using flow cytometrically sorted spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29, n. 4, p. 805-814, 2017.

FERREIRA, Laís Dantas et al. Maturação, capacitação, reação acrossômica e movimento espermático. **Ciência Animal**, v. 33, n. 3, p. 82 a 97-82 a 97, 2023.

FERRER, Marvin et al. MMP2 e acrosina são importantes proteinases associadas à membrana acrossômica interna e podem cooperar na penetração do espermatozoide na zona pelúcida durante a fertilização. **Pesquisa celular e tecidual**, v. 349, n. 3, p. 881-895, 2012.

FIALA SM, JOBIM MIM, GREGORY RM, MATTOS RC. Sperm distribution in the oviduct and uterus of mares within two hours after artificial insemination. *Pferdeheilkunde*, v. 24, p. 96-98, 2008.

FISCHER, B.; BAVISTER, B. D. Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits. **Reproduction**, v. 99, n. 2, p. 673-679, 1993.

FLEMING, STEVEN D., E LAURA K. THOMSON. "O estresse oxidativo da criopreservação de espermatozoides humanos." **Antioxidants** 14, nº 4 (2025): 402.

FLORMAN, Harvey M. et al. Regulação da reação acrossômica. **Int J Dev Biol** , v. 52, n. 5-6, p. 503-510, 2008.

FORDE, N., & LONERGAN, P. (2017). Interferon-tau e fertilidade em ruminantes. **Reproduction**, 154(5), F33–F43. <https://doi.org/10.1530/rep-17-0432>.

GAHLAY, Gagandeep et al. O reconhecimento de gametas em camundongos depende do status de clivagem da proteína da zona pelúcida do ovo. **Ciência** , v. 329, n. 5988, pág. 216-219, 2010.

GANGWAR, DK; ATREJA, SK. Eventos de sinalização e vias associadas relacionadas à capacitação espermática em mamíferos. **Reproduction in Domestic Animals** , v. 50, n. 5, p. 705-711, 2015.

GASPARRINI, Bianca et al. Effect of gametes co-incubation time on in vitro fertilization and embryo development in buffalo species (*Bubalus bubalis*). 2004.

GASPARRINI, Bianca et al. Influence of the duration of in vitro maturation and gamete co-incubation on the efficiency of in vitro embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal reproduction science**, v. 105, n. 3-4, p. 354-364, 2008.

GAVRILIOUK, D., & AITKEN, RJ (2015). Danos ao DNA espermático mediados por espécies reativas de oxigênio: seu impacto na reprodução humana e na trajetória de saúde da prole. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 868, 23–47. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-18881-2_2)

GIANAROLI, L., MAGLI, MC, FERRARETTI, AP, FIORENTINO, A., TOSTI, E., PANZELLA, S., & DALE, B. (1996). Reduzir o tempo de interação espermatozoide-oócito na fertilização in vitro humana melhora a taxa de implantação. **Human Reproduction**, 11(1), 166–171. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a019011>

GIL, MA, ALMIÑANA, C., CUELLO, C., PARRILLA, I., ROCA, J., VAZQUEZ, JM, & MARTINEZ, EA (2007). Breve co-incubação de gametas na fertilização in vitro suína: papel da proporção espermatozoide:oócito e do meio pós-co-incubação. **Theriogenology**, 67(3), 620–626. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.022>

GORDON, Ian. **Produção laboratorial de embriões bovinos** . Cabi, 2003.

GOUVEIA, Duarte Domingos. Influência da oxidação da BSA na sua digestão proteolítica. 2012. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de Aveiro (Portugal).

GRIPPO, AA; WAY, AL; KILLIAN, GJ. Efeito do fluido ovidutal ampular e istmico bovino na motilidade, reação acrossômica e fertilidade dos espermatozoides de touro. **Reproduction** , v. 105, n. 1, p. 57-64, 1995.

GUALTIERI, Roberto et al. Sperm oxidative stress during in vitro manipulation and its effects on sperm function and embryo development. **Antioxidants**, v. 10, n. 7, p. 1025, 2021.

GUALTIERI, Roberto; TALEVI, Riccardo. Células do oviduto bovino cultivadas in vitro ligam-se a espermatozoides com acrossoma intacto e retêm essa capacidade após a liberação dos espermatozoides. **Biologia da reprodução** , v. 62, n. 6, p. 1754-1762, 2000.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Estresse oxidativo e proteção contra espécies reativas de oxigênio no embrião pré-implantacional e seu entorno. **Human reproduction update** , v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001.

GWATHMEY, TanYa M. et al. As proteínas do plasma seminal bovino PDC-109, BSP-A3 e BSP-30-kDa compartilham funções no armazenamento de espermatozoides no oviduto. **Biologia da reprodução** , v. 75, n. 4, p. 501-507, 2006.

GWATHMEY, TM, IGNOTZ, GG, & SUAREZ, SS (2003). PDC-109 (BSP-A1/A2) Promotes Bull Sperm Binding to Oviductal Epithelium In Vitro and May Be Involved in Forming the Oviductal Sperm Reservoir1. **Biology of Reproduction**, 69(3), 809–815. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.010827>

HANSEN, PJ (2013). Tecnologias atuais e futuras de reprodução assistida para animais de criação mamíferos. **Tecnologias atuais e futuras de reprodução e produção mundial de alimentos**, 752, 1–22. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8887-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8887-3_1)

HARPER, M. J. K., AUSTIN, C. R., & SHORT, R. V. (1982). Germ cells and fertilization.

HEGARTY, RS; MCEWAN, JC. Oportunidades genéticas para reduzir as emissões entéricas de metano em ruminantes. In: **Anais do 9º Congresso Mundial de Genética Aplicada à Produção Animal, Leipzig, Alemanha** . 2010. p. 1-6.

HENCHION, M. et al. Trends for meat, milk and egg consumption for the next decades and the role played by livestock systems in the global production of proteins. **Animal**, v. 15, p. 100287, 2021.

HENKEL, RR, & SCHILL, WB (2003). Preparação de espermatozoides para TRA. **Biologia Reprodutiva e Endocrinologia**, 1, 108. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-108>

HINO, Ti et al. O comportamento e o estado acrossômico dos espermatozoides de camundongo in vitro e dentro do oviduto durante a fertilização após acasalamento natural. **Biologia da reprodução** , v. 95, n. 3, p. 50, 1-11, 2016.

HIROHASHI, Noritaka; YANAGIMACHI, Ryuzo. Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization. **Biology of reproduction**, v. 99, n. 1, p. 127-133, 2018.

Hoffner, L., & Surti, U. (2012). A genética da doença trofoblástica gestacional: uma complicação rara da gravidez. *Genética do câncer*, 205(3), 63-77. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2012.01.004>

HOLT, William V.; FAZELI, Alireza. The oviduct as a complex mediator of mammalian sperm function and selection. **Molecular reproduction and development**, v. 77, n. 11, p. 934-943, 2010.

HOLT, WV; FAZELI, A. Seleção de espermatozoides no trato reprodutivo feminino de mamíferos. Foco no oviduto: hipóteses, mecanismos e novas oportunidades. **Theriogenology** , v. 85, n. 1, p. 105-112, 2016.

HOLT, WV; FAZELI, A. Seleção de espermatozoides no trato reprodutivo feminino de mamíferos. Foco no oviduto: hipóteses, mecanismos e novas oportunidades. **Theriogenology** , v. 85, n. 1, p. 105-112, 2016.

HU K, HUANG F, CHEN H, QU HM, LI XP, WANG XY, WANG JR, NIU P, FANG D, GAO Q. Comparison of semen preservation methods and in vitro fertilization embryo quality in Simmental cattle. **Anim Biosci.** 2025 Nov 25. doi: 10.5713/ab.250410. Epub ahead of print. PMID: 41289951.

HUNTER, R., & GADEA, J. (2015). Questões pendentes relativas à ligação espermatozoide-epitélio no oviduto de mamíferos. **Zygote**, 24(3), 389–395. <https://doi.org/10.1017/s0967199415000301>

HUNTER, RHF Componentes da fisiologia do oviduto em mamíferos eutérios. **Biological Reviews** , v. 87, n. 1, p. 244-255, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00196.x>

HUNTER, RHF Transporte e reservatórios de espermatozoides no oviduto suíno em relação ao momento da ovulação. **Reproduction** , v. 63, n. 1, p. 109-117, 1981. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0630109>

HUNTER, RHF; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Capacitação de espermatozoides de mamíferos in vivo, com foco específico em eventos nas trompas de Falópio. **Reprodução e Desenvolvimento Molecular: Incorporando Pesquisa de Gametas** , v. 67, n. 2, p. 243-250, 2004. <https://doi.org/10.1002/mrd.10390>

HYTTEL, P., GREVE, T., & CALLESEN, H. (1988). Ultraestrutura da fertilização in vivo em bovinos superovulados. **Reproduction**, 82(1), 1-13. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0820001>

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas). Rio de Janeiro: **IBGE**, 2025. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>>. Acesso em: 22 de jan de 2026.

ICKOWICZ, D; FINKELSTEIN, M; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian journal of andrology**, v. 14, n. 6, p. 816, 2012.

IGNOTZ, GG.; CHO, M Y.; SUAREZ, SS. Anexinas são potenciais receptores ovidutais para proteínas da superfície de espermatozoides bovinos e, portanto, podem servir para manter os espermatozoides bovinos no reservatório ovidutal. **Biologia da reprodução**, v. 77, n. 6, p. 906-913, 2007.

IWATA, H et al. Effects of modification of in vitro fertilization techniques on the sex ratio of the resultant bovine embryos. **Animal reproduction science**, v. 105, n. 3-4, p. 234-244, 2008.

J. LAURINČÍK, P. HYTTEL, BARAN, V., ECKERT, J., A. LUCAS-HAHN, J. PIVKO, NIEMANN, H., BREM, G., & K. SCHELLANDER. (1998). Uma análise detalhada do desenvolvimento do pronúcleo em zigotos bovinos in vitro: cronologia do ciclo celular e ultraestrutura. **Reprodução e Desenvolvimento Molecular**, 50(2), 192–199. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2795\(199806\)50:2%3C192::aid-mrd10%3E3.0.co;2-9](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2795(199806)50:2%3C192::aid-mrd10%3E3.0.co;2-9)

JIN, M., FUJIWARA, E., KAKIUCHI, Y., OKABE, M., SATOUH, Y., BABA, SA, ... & HIROHASHI, N. (2011). A maioria dos espermatozoides de camundongos em fertilização inicia sua reação acrossômica antes do contato com a zona pelúcida durante a fertilização in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 108 (12), 4892-4896.

JOMOVA, K., ALOMAR, SY, ALWASEL, SH, NEPOVIMOVA, E., KUCA, K., & VALKO, M. (2024). Várias linhas de defesa antioxidante contra o estresse oxidativo: enzimas antioxidantes, nanomateriais com múltiplas atividades que imitam enzimas e antioxidantes de baixo peso molecular. **Archives of toxicology**, 98(5), 1323-1367.

KARUNAKARAN, M., & DEVANATHAN, TG (2016). Avaliação do sêmen bovino quanto à proteína associada à fertilidade, características in vitro e fertilidade. **Journal of Applied Animal Research**, 45(1), 136–144. <https://doi.org/10.1080/09712119.2015.1129343>

KEANE, Jessica A.; EALY, Alan D. An overview of reactive oxygen species damage occurring during in vitro bovine oocyte and embryo development and the efficacy of antioxidant use to limit these adverse effects. **Animals**, v. 14, n. 2, p. 330, 2024.

KILLIAN, G. (2011). Simpósio de fisiologia e endocrinologia: Evidências de que as secreções do oviduto influenciam a função espermática: uma visão retrospectiva para o gado. **Journal of Animal Science**, 89(5), 1315–1322. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3349>

KIM, B.-K., LEE, S.-C., LEE, K.-S., LEE, B.-K., HAN, C.-H., KIM, J.-H., & LEE, C.-S. (2002). Efeito do meio de cultura na penetração de espermatozoides e na formação de pronúcleos em oócitos bovinos maturados in vitro. **Theriogenology**, 57(8), 2093–2104. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(02\)00695-7](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(02)00695-7)

KOCHHAR, Harpreet S. et al. Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. **Animal reproduction science**, v. 77, n. 1-2, p. 33-49, 2003.

KOLLE, S. ET AL. Transporte ciliar, interação de gametas e efeitos do embrião inicial no oviduto: análises ex vivo usando um novo sistema de videomicroscopia digital em vacas. **Biol. Reprod.** 81 , 267–274. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.073874>

KOO, Deog-Bon et al. Effects of in vitro fertilization conditions on preimplantation development and quality of pig embryos. **Animal reproduction science**, v. 90, n. 1-2, p. 101-110, 2005.

KOPPERS, Adam J.; GARG, Manohar L.; AITKEN, Robert J. Stimulation of mitochondrial reactive oxygen species production by unesterified, unsaturated fatty acids in defective human spermatozoa. **Free radical biology and medicine**, v. 48, n. 1, p. 112-119, 2010.

KOPPERS, AJ, DE IULIIS, GN, FINNIE, JM, MCLAUGHLIN, EA, & AITKEN, RJ (2008). Significado das espécies reativas de oxigênio mitocondrial na geração de estresse oxidativo em espermatozoides. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 93(8), 3199–3207. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2616>.

KRISHER, Rebecca L.; HERRICK, Jason R. Produção de embriões bovinos in vitro: evolução dos meios de cultura e perspectivas comerciais. **Animal Reproduction** , v. 21, n. 3, p. e20240051, 2024.

KWAK, Seong-Sung; HYUN, Sang-Hwan. Effects of a Short Co-Incubation Time for Spermatozoa-Oocytes Using Commercial Liquid Stored Boar Semen on Porcine in vitro Fertilization Efficiency. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 8, p. 1087-1095, 2012.

LAMY J, NOGUES P, COMBES-SOIA L, TSIKIS G, LABAS V, MERMILLOD P, DRUART X, SAINT-DIZIER M. Identificação por proteômica de proteínas que interagem com espermatozoides ovidutais. **Reprodução**, 2018;155:457–466.

LEE, CN, & AX, RL (1984). Concentrações e composição de glicosaminoglicanos no trato reprodutivo de fêmeas bovinas. **Journal of Dairy Science**, 67(9), 2006–2009. [https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302\(84\)81536-2](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(84)81536-2)

LEE, Tsung-Hsien et al. A triagem celular ativada magneticamente para preparação de espermatozoides reduz os espermatozoides com marcadores apoptóticos e melhora a reação acrossômica em casais com infertilidade inexplicada. **Human Reproduction** , v. 25, n. 4, p. 839-846, 2010.

LEEMANS, Bart et al. A ligação ao oviduto e o pH ambiental elevado induzem a fosforilação da tirosina de proteínas em espermatozoides de garanhões. **Biology of Reproduction** , v. 91, n. 1, p. 13, 1-12, 2014.

LEEMANS, Bart et al. Atualização sobre a capacitação espermática em mamíferos: em que medida o cavalo difere de outras espécies?. **Reproduction** , v. 157, n. 5, p. R181-R197, 2019.

Lefebvre, Rejean, Margaret C. Lo E Susan S. Suarez. "A ligação do esperma bovino ao epitélio do oviduto envolve o reconhecimento da fucose." **Biologia da Reprodução** 56.5 (1997): 1198-1204.

LIAUDAT, Ana Cecilia et al. O calcitriol induz a capacitação de espermatozoides bovinos após o descongelamento. 2023.

LONERGAN, P.; FAIR, T. Embriões bovinos produzidos in vitro — lidando com as imperfeições. **Theriogenology** , v. 69, n. 1, p. 17-22, 2008.

LONERGAN, Patrick; FAIR, Trudee. Maturação de oócitos in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences** , v. 4, n. 1, p. 255-268, 2016.

MACÍAS-GARCÍA, B., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, L., LOUX, SC, ROCHA, AM, GUIMARÃES, T., PEÑA, FJ, VARNER, DD, & HINRICHS, K. (2015). Efeito do cálcio, bicarbonato e albumina em eventos relacionados à capacitação em espermatozoides equinos. **Reprodução**, 149(1), 87–99. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0457>

MATSUYAMA, S., KOJIMA, T., KATO, S., & KIMURA, K. (2012). Relação entre a quantidade de IFNT estimada pela expressão gênica estimulada por IFN em células mononucleares do sangue periférico e a mortalidade embrionária bovina após IA ou TE. **Biologia Reprodutiva e Endocrinologia**, 10(1).<https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-21>.

MILLER, David J. Espermatozoides no trato reprodutivo feminino de mamíferos: navegando pelo trato para tentar vencer as probabilidades. **Annual review of animal biosciences** , v. 12, n. 1, p. 301-319, 2024.. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-021022-040629>

MORALES, H. et al. Pyruvate prevents peroxide-induced injury of in vitro preimplantation bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, v. 52, n. 2, p. 149-157, 1999.

MORTON, Katherine M. et al. The effect of gamete co-incubation time during in vitro fertilization with frozen-thawed unsorted and sex-sorted ram spermatozoa on the development of in vitro matured adult and prepubertal ewe oocytes. **Theriogenology**, v. 64, n. 2, p. 363-377, 2005.

MOTTET, Anne et al. Herbívoros domésticos e segurança alimentar: contribuição atual, tendências e desafios para um desenvolvimento sustentável. **Animal** , v. 12, n. s2, p. s188-s198, 2018.

MUELLER, Maci L.; VAN EENENNAAM, Alison L. Poder sinérgico da seleção genômica, tecnologias de reprodução assistida e edição genética para impulsionar o

melhoramento genético do gado. **CABI Agriculture and Bioscience** , v. 3, n. 1, p. 13, 2022.

MUELLER, Maci L.; VAN EENENNAAM, Alison L. Synergistic power of genomic selection, assisted reproductive technologies, and gene editing to drive genetic improvement of cattle. **CABI Agriculture and Bioscience**, v. 3, n. 1, p. 13, 2022.

MURATORI, M. et al. Seleção de espermatozoides com centrifugação em gradiente de densidade e swim-up: efeito na fragmentação do DNA em espermatozoides viáveis. **Scientific reports** , v. 9, n. 1, p. 1-12, 2019.

MURO, Y., HASUWA, H., ISOTANI, A., MIYATA, H., YAMAGATA, K., IKAWA, M., ... & OKABE, M. (2016). Comportamento dos espermatozoides de camundongo no trato reprodutivo feminino desde logo após o acasalamento até o início da fertilização. **Biologia da Reprodução**, 94 (4), 80-1.

NAMULA, Zhao et al. Improvement of the in vitro fertilization and embryo development using frozen–thawed spermatozoa of microminipigs. **Archives Animal Breeding**, v. 64, n. 1, p. 265-271, 2021.

NAZ, RK, & RAJESH, PB (2004). Papel da fosforilação de tirosina na capacitação espermática / reação acrossômica. **Biologia Reprodutiva e Endocrinologia**, 2(1), 75. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-2-75>.

NAZARI, H., Esfandabadi, N., Shirazi, A., Ahadi, AM, Ahmadi, E., & Safdarinejad, A. (2022). Efeito do período de maturação do oócito na taxa de desenvolvimento e distribuição da proporção sexual de embriões bovinos produzidos in vitro. **Iranian Journal of Applied Animal Science** , 12 (2).

NEDAMBALE, T. L. et al. Prolonging bovine sperm–oocyte incubation in modified medium 199 improves embryo development rate and the viability of vitrified blastocysts. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 1951-1960, 2006.

NOMIKOS, Michael; KASHIR, Junaid; LAI, F. Anthony. O papel e mecanismo de ação do esperma PLC-zeta na fertilização de mamíferos. **Revista Bioquímica** , v. 474, n. 21, pág. 3659-3673, 2017.

OBERLENDER, Guilherme et al. In vitro fertilization of porcine oocytes is affected by spermatocoincubation time. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, p. 58-64, 2016.

OECD & FAO. (2021). OECD-FAO Agricultural Outlook 2021-2030. OECD Publishing / FAO.

OJO, Ayooluwa O. et al. Explorando a eficiência alimentar em bovinos de corte: da coleta de dados à modelagem genética e nutricional. **Animals**, v. 14, n. 24, p. 3633, 2024.

PAHUNE, Pranjali Prabhakarrao; CHOUDHARI, Ajay Rajeshwar; MULEY, Parikshit Ashok. The total antioxidant power of semen and its correlation with the fertility potential of human male subjects. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 6, p. 991, 2013.

PALOMO, M. J. et al. The influence of sperm concentration, length of the gamete coculture and the evolution of different sperm parameters on the in vitro fertilization of prepubertal goat oocytes. **Zygote**, v. 18, n. 4, p. 345-355, 2010.

PARRISH, JJ et al. Capacitação de espermatozoides bovinos por heparina. **Biologia da reprodução**, v. 38, n. 5, p. 1171-1180, 1988.

PASQUARIELLO, Rolando et al. Uso de tecnologias de reprodução assistida (TRA) para encurtar o intervalo geracional em ruminantes: situação atual e perspectivas. **Theriogenology**, v. 225, p. 16-32, 2024.

PERIS-FRAU, P., SOLER, AJ, INIESTA-CUERDA, M., MARTÍN-MAESTRO, A., SÁNCHEZ-AJOFRÍN, I., MEDINA-CHÁVEZ, DA, ... & GARDE, JJ (2020). Danos espermáticos causados pela criopreservação em ruminantes: compreendendo as alterações moleculares induzidas pelo processo de criopreservação para otimizar a qualidade do sêmen. **International journal of molecular sciences**, 21 (8), 2781.

PIOLTINE, EM Uso de TUDCA na modulação do estresse do retículo endoplasmático durante estágios de produção in vitro de embriões bovinos. 2020. **Dissertação Mestrado** – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Jaboticabal, 2020.

PLOURDE, D., VIGNEAULT, C., LAFLAMME, I., BLONDIN, P., & ROBERT, C. (2012). Caracterização celular e molecular do impacto da configuração do laboratório na produção de embriões bovinos in vitro. **Theriogenology** , 77 (9), 1767-1778.

RAGO, Vittoria et al. Detecção dos receptores de estrogênio ER-alfa e ER-beta em espermatozoides imaturos ejaculados humanos com excesso de citoplasma residual. **Biologia Reprodutiva e Endocrinologia** , v. 4, n. 1, p. 36, 2006.

REHMAN, N. et al. Effect of sperm exposure time on in vitro fertilization and embryo development of bovine oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v. 41, n. 7, p. 1447-1452, 1994.

RIBAS-MAYNOU, J., YESTE, M., BECERRA-TOMÁS, N., ASTON, KI, JAMES, ER, & SALAS-HUETOS, A. (2021). Implicações clínicas do dano ao DNA espermático na FIV e ICSI: revisão sistemática e meta-análise atualizadas. **Biological Reviews**, 96(4), 1284–1300. <https://doi.org/10.1111/brv.12700>.

RIZOS, D., WARD, F., DUFFY, PAT, BOLAND, MP, & LONERGAN, P. (2002). Consequências da maturação de oócitos bovinos, fertilização ou desenvolvimento embrionário inicial in vitro versus in vivo: implicações para o rendimento e a qualidade de blastocistos. **Reprodução e desenvolvimento molecular**, 61 (2), 234-248.

ROCA, Jordi et al. Espermatozoides mortos em amostras de sêmen bruto prejudicam os resultados da fertilização in vitro com espermatozoides descongelados. **Fertility and Sterility** , v. 100, n. 3, p. 875-881, 2013.

ROCHA-FRIGONI, NAS, LEÃO, BCS, NOGUEIRA, E., ACCORSI, MF, & MINGOTI, GZ (2014). Níveis reduzidos de espécies reativas de oxigênio intracelulares e estado apoptótico não estão correlacionados com aumentos na criotolerância de embriões bovinos produzidos in vitro na presença de antioxidantes. **Reproduction, Fertility and Development**, 26(6), 797–797. <https://doi.org/10.1071/rd12354>.

ROMERO-AGUIRREGOMEZCORTA, Jon et al. Progesterone induces the release of bull spermatozoa from oviductal epithelial cells. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 31, n. 9, p. 1463-1472, 2019.

SAHA, S., KHANDOKER, MAMY, ASAD, LY, REZA, AMMT, & HOQUE, A. (2014). Efeito do sêmen fresco e congelado na fertilização in vitro e desenvolvimento subsequente de embriões de cabra. **Iranian Journal of Applied Animal Science** , 4 (2).

SAKATANI, M., YAMANAKA, K., BALBOULA, AZ, TAKENOUCI, N., & TAKAHASHI, M. (2015). O estresse térmico durante a fertilização in vitro diminui o sucesso da fertilização ao interromper os sistemas anti-polispermia dos oócitos. **Reprodução e Desenvolvimento Molecular**, 82(1), 36-47. <https://doi.org/10.1002/mrd.22441>

SALEH, Ramadan A. et al. A leucocitospermia está associada ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio pelos espermatozoides humanos. **Fertilidade e esterilidade** , v. 78, n. 6, p. 1215-1224, 2002.

SANTOS, Maria Valéria de Oliveira et al. Effects of capacitating media and incubation time on collared peccary sperm quality, acrosome reaction, and binding ability. **Animal Production Science**, v. 63, n. 17, p. 1740-1749, 2023.

SATTAR, A., RUBESSA, M., DI FRANCESCO, S., LONGOBARDI, V., DI PALO, R., ZICARELLI, L., ... & GASPARRINI, B. (2011). A influência do tempo de co-incubação dos gametas na fertilidade in vitro e na proporção sexual de touros bovinos com diferentes velocidades de penetração. **Reprodução em Animais Domésticos**, 46(6), 1090-1097.

SCHIFFER, C., RIEGER, S., BRENKER, C., YOUNG, S., HAMZEH, H., WACHTEN, D., ... & STRÜNKER, T. (2020). O movimento rotacional e a reotaxia dos espermatozoides humanos não requerem canais CatSper funcionais e sinalização transmembrana de Ca<sup>2+</sup>. **The EMBRYO journal** , 39 (4), e102363.

SCHUETZ, ALLEN W.; DUBIN, NORMAN H. Secreção de progesterona e prostaglandina por complexos de células do cumulus-oócito de ratas ovuladas. **Endocrinology** , v. 108, n. 2, p. 457-463, 1981.

SEOL, Dong-Won et al. A hialuronidase espermática é fundamental para a fertilização em mamíferos devido à sua capacidade de dispersar a camada do complexo cúmulo-oócito. **Asian Journal of Andrology** , v. 24, n. 4, p. 411-415, 2022.

SIGNORELLI, Janetti; DIAZ, Emilce S.; MORALES, Patricio. Quinases, fosfatases e proteases durante a capacitação espermática. **Pesquisa celular e tecidual** , v. 349, n. 3, p. 765-782, 2012.

SILVA, PFN, GADELLA, BM, COLENBRANDER, B., & ROELEN, BAJ (2007). A exposição de espermatozoides bovinos a pró-oxidantes prejudica a competência de desenvolvimento do embrião após a primeira clivagem. **Theriogenology**, 67(3), 609–619. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.032>

SIMÕES, R., FEITOSA, WB, SIQUEIRA, AFP, NICHI, M., PAULA-LOPES, FF, MARQUES, MG, PERES, MA, BARNABE, VH, VISINTIN, JA, & ASSUMPÇÃO, MEO (2013). Influência da fragmentação do DNA do espermatozóide bovino e do estresse oxidativo no resultado do desenvolvimento in vitro do embrião inicial. **Fertilidade e Desenvolvimento de Reprodução**, 146(5), 433–441. <https://doi.org/10.1530/rep-13-0123>

SIMONS, J; FAUCI, L. Um modelo para a reação acrossômica em espermatozoides de mamíferos. **Boletim de biologia matemática** , v. 80, n. 9, p. 2481-2501, 2018.

SIRARD, M.-A. Factors affecting oocyte and embryo transcriptomes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, p. 148-155, 2012.

SIRARD, M.-A. The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v. 8, n. 4, p. 411-417, 2017.

SOBRERO, A J.; MACLEOD, John. O teste pós-coito imediato. **Fertilidade e esterilidade** , v. 13, n. 2, p. 184-189, 1962. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)34447-8](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)34447-8)

SOLIMAN WTM, MAHMOUD KGM, EL-KHAWAGAH ARM, KANDIEL MMM, ABOUEL-ROOS MEA, ABDEL-GHAFFAR AE, EL AZAB AEI. Impact of in vitro fertilization by fresh and frozen semen on developmental competence and cryotolerance of buffalo embryos. **Iran J Vet Res**. 2018 Summer;19(3):178-181. PMID: 30349563; PMCID: PMC6184035.

STRINGFELLOW, DA, & SEIDEL, SM (1998). **Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões**. IETS. Illinois. p. 112 - 113

STRÜNKER, Timo et al. O canal CatSper medeia o influxo de Ca<sup>2+</sup> induzido pela progesterona em espermatozoides humanos. **Nature** , v. 471, n. 7338, p. 382-386, 2011.

Suarez, SS (2008). Regulação do armazenamento e movimento de espermatozoides no oviduto de mamíferos. **The International journal of developmental biology**, 52(5-6), 455-462. <https://doi.org/10.1387/ijdb.072527ss>

Suarez, SS, & Pacey, AA (2005). Transporte de espermatozoides no trato reprodutivo feminino. **Human Reproduction Update**, 12(1), 23–37. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>

SUAREZ, Susan S. Formação de um reservatório de espermatozoides no oviduto. **Reprodução em Animais Domésticos** , v. 37, n. 3, p. 140-143, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2002.00346.x>

SUAREZ, Susan S.; PACEY, AA. Transporte de espermatozoides no trato reprodutivo feminino. **Human reproduction update** , v. 12, n. 1, p. 23-37, 2006. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi047>

SUMANTRI, Cece et al. The effect of sperm-oocyte incubation time on in vitro embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. **Animal Reproduction Science**, v. 48, n. 2-4, p. 187-195, 1997.

SWAIN, Jason E. Cultivo ideal de embriões humanos. In: **Seminários em medicina reprodutiva** . Thieme Medical Publishers, 2015. p. 103-117.

SWANN, K. et al. PLC $\zeta$  (zeta): uma proteína espermática que desencadeia oscilações de Ca<sup>2+</sup> e ativação do óvulo em mamíferos. In: **Seminars in cell & developmental biology** . Academic Press, 2006. p. 264-273.

TAN, W. L.; WE, Wan Khadijah; ABDULLAH, R. B. Effect of Sperm Insemination Duration on in Vitro Fertilisation (IVF) Performance in Goats. **Malaysian Journal of Science**, v. 30, n. 2, p. 105-111, 2011.

TELFORD, Nancy A.; WATSON, Andrew J.; SCHULTZ, Gilbert A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. 1990.

THOMPSON, JG, ALLEN, NW, MCGOWAN, LT, BELL, AC, LAMBERT, MG, & TERVIT, HR (1998). Efeito da suplementação tardia de soro fetal bovino ao meio de cultura no desenvolvimento de embriões bovinos in vitro e após transferência. **Theriogenology**, 49(6), 1239–1249. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00071-5](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00071-5)

TOLLNER TL, YUDIN AI, TARANTAL AF, TREECE CA, OVERSTREET JW, CHERR GN. A beta-defensina 126 na superfície do espermatozoide do macaco medeia a fixação do espermatozoide ao epitélio do oviduto. **Biology of Reproduction**. 2008;78: 400– 412.

TORRES-OSORIO, V., Urrego, R., ECHEVERRI-ZULUAGA, JJ, LÓPEZ-HERRERA, A.,(2019). Estresse oxidativo e utilização de antioxidantes na produção in vitro de embriões de mamíferos. Análise. **Revista Mexicana de Ciências Animais**, 10(2), 433–459. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v10i2.4652>

VENTURA-JUNCÁ, Patricio et al. Fertilização in vitro (FIV) em mamíferos: alterações epigenéticas e de desenvolvimento. Implicações científicas e bioéticas para a FIV em humanos. **Pesquisa Biológica** , v. 48, n. 1, p. 68, 2015.

VISCONTI, P. E., BAILEY, J. L., MOORE, G. D., PAN, D., OLDS-CLARKE, P., & KOPF, G. S. (1995). Capacitation of mouse spermatozoa: I. Correlation between the capacitation state and protein tyrosine phosphorylation. **Development**, 121(4), 1129-1137.

VIUFF, D., RICKORDS, L., OFFENBERG, H., HYTTEL, P., AVERY, B., GREVE, T., OLSAKER, I., WILLIAMS, JL, CALLESEN, H., & THOMSEN, PD (1999). Uma alta proporção de blastocistos bovinos produzidos in vitro são mixoploides. **Biology of Reproduction** , 60(5), 1273–1278. <https://doi.org/10.1095/biolreprod60.5.1273>

VOGT, Edgar-John et al. Ancoragem de grânulos corticais no córtex garante o transporte para a membrana plasmática para exocitose pós-fertilização. **Nature communications** , v. 10, n. 1, p. 2271, 2019.

WANG, W., HOSOE, M., LI, R., & SHIOYA, Y. (1997). Desenvolvimento da competência dos oócitos bovinos para liberar grânulos corticais e bloquear a polispermia após a maturação meiótica. **Desenvolvimento, crescimento e diferenciação**, 39(5), 607-615. <https://doi.org/10.1046/j.1440-169X.1997.t01-4-00008.x>

WANG, WH, DAY, BN, & WU, GM (2003). Como ocorre a polispermia em oócitos de mamíferos? **Pesquisa e técnica de microscopia**, 61(4), 335-341. <https://doi.org/10.1002/jemt.10346>

WARD, Fabian et al. Optimization of in vitro bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. **Theriogenology**, v. 57, n. 8, p. 2105-2117, 2002.

WOSSIDLO, Mark et al. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. **Nature communications**, v. 2, n. 1, p. 241, 2011.

WOZNIAK, KL, & Carlson, AE (2020). Canais iônicos e vias de sinalização utilizadas no bloqueio rápido da polispermia. **Reprodução e Desenvolvimento Molecular**, 87(3), 350-357. <https://doi.org/10.1002/mrd.23168>

YAMASHITA, Yasuhisa et al. Produção de progesterona a partir de colesterol sintetizado de novo em células do cumulus e seu papel fisiológico durante a retomada da meiose em oócitos suínos. **Biology of Reproduction**, v. 68, n. 4, p. 1193-1198, 2003.

YANAGIMACHI, R. Fertilidade dos espermatozoides de mamíferos: seu desenvolvimento e relatividade. **Zygote**, v. 2, n. 4, p. 371-372, 1994.

YAO, T et al. Imagem de células vivas da dinâmica núcleo-cromossômica em embriões bovinos fertilizados in vitro. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7460, 2018.