

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Sobrevivência *in vitro* de sêmen criopreservado equino e de ruminantes após indução à capacitação espermática e da reação acrossômica para aplicação na produção *in vitro* de embriões

Autor: Eduardo de Oliveira Sanguinet

PORTO ALEGRE

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Sobrevivência *in vitro* de sêmen criopreservado equino e de ruminantes após indução à capacitação espermática e da reação acrossômica para aplicação na produção *in vitro* de embriões

Autor: Eduardo de Oliveira Sanguinet
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Biotécnicas da Reprodução.
Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bertolini

PORTO ALEGRE
2020

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

CIP - Catalogação na Publicação

Sanguinet, Eduardo de Oliveira
Sobrevivência in vitro de sêmen criopreservado equino e de ruminantes após indução a capacitação espermiática e da reação acrossômica para aplicação na produção in vitro de embriões / Eduardo de Oliveira Sanguinet. -- 2020.
118 f.
Orientador: Marcelo Bertolini.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2020.

1. Fecundação in vitro. 2. Sêmen equino criopreservado. 3. capacitação espermiática. 4. reação acrossômica. 5. mamíferos. I. Bertolini, Marcelo, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Eduardo de Oliveira Sanguinet

Sobrevivência *in vitro* de sêmen criopreservado equino e de ruminantes após indução à capacitação espermática e da reação acrossômica para aplicação na produção *in vitro* de embriões

Aprovado em 2020

APROVADO POR:

Prof. Dr. Marcelo Bertolini – FAVET/UFRGS

Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dra. Adriana Bos-Mikich – ICBS/UFRGS

Membro da Comissão

Prof. Dra. Ana Paula Gonçalves Mellagi – FAVET/UFRGS

Membro da Comissão

Prof. Dra. Monique Tomazele Rovani – FAVET/UFRGS

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço muito ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Bertolini, que auxiliou durante todo o desenvolvimento do trabalho, lendo o texto, incentivando na busca de referências, conseguindo material e me indicando o melhor caminho a seguir, superando todas as minhas expectativas e tornando a execução da minha dissertação muito mais fácil.

Ao Prof. Dr. José Luiz R. Rodrigues por todas as valiosas correções e dicas para continuidade do trabalho, que me ajudaram a tomar decisões importantes.

Aos bolsistas e técnicos do laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução que auxiliaram na construção efetiva do meu trabalho. Sem eles e a estrutura do laboratório seria impossível executar este trabalho e por isso sou muito grato. Agradeço, especialmente, a bolsista Louise Fontoura Köhler que esteve do meu lado em muitos momentos, muitos dias, noites e finais de semanas me ajudando incansavelmente, fazendo os experimentos e trabalhos comigo, muito obrigado.

A UFRGS e seus professores por proporcionar crescimento pessoal e profissional, oferecendo oportunidades e trocas de conhecimento com colegas e professores. Sou privilegiado por estar finalizando um curso de mestrado em uma Universidade Federal como esta e por isso agradeço por todas as portas que foram abertas em virtude disto.

Ao Médico Veterinário Frederico Lança Schmitt que me concedeu as amostras de sêmen equinos que foram essenciais para a realização do meu trabalho, proprietário da Central de Equinos Schmitt & Gonzales Ltda, em São Jerônimo, RS

Aos amigos, muito obrigado pelas palavras de apoio, pela companhia e pela amizade sempre verdadeira e sincera. Deixar a dissertação de lado por alguns momentos para estar com vocês foi essencial para manter o foco e o entusiasmo.

Aos meus amigos do laboratório, obrigado pelo apoio durante todo o curso, o aprendizado e crescimento que tive atuando neste grupo foi essencial para meu desenvolvimento profissional e a amizade de vocês foi o melhor presente que recebi durante esses dois anos.

Finalmente, obrigado a minha família por todo o amor e paciência. Ao meu irmão que esteve muito presente durante todos os meus anos de mestrado, aturando minhas loucuras com provas e experimentos, cozinhando quando eu não tinha tempo, revisando e formatando absolutamente todos os trabalhos das cadeiras da pós e sendo meu grande companheiro. Aos meus pais, Elizabete Rodrigues e Jorge Benhur, por todo apoio até hoje. Meu querido pai que sempre me ajudou em tudo, emocional e também financeiro. Minha amada mãe, que hoje não está mais presente de forma física, mas sei que o amor e apoio ainda segue, e assim vai ser durante toda minha vida. Obrigado a vocês por tudo, pois sempre priorizaram a minha educação, que hoje culmina com um curso de mestrado em uma Universidade Federal, o que é também mérito de vocês. Obrigado por estarem sempre ao meu lado me proporcionando a oportunidade de poder ser mestre em Ciências Veterinárias.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi determinar a eficiência de um protocolo de indução de capacitação espermática e de reação acrossômica *in vitro* em sêmen criopreservado de espécies mamíferas domésticas para uso na fecundação *in vitro* (FIV), utilizando a espécie bovina como modelo e controle. No Experimento I, comparou-se o efeito de diferentes concentrações de heparina (5, 10 e 15 UI/mL) na indução da capacitação espermática (CE) *in vitro* do sêmen criopreservado das espécies bovina, bubalina, ovina, caprina e equina. Também se avaliou a resposta do sêmen bovino capacitado *in vitro* ao cálcio ionóforo (A23187) para a indução da reação acrossômica (RA) *in vitro* e, por fim, este foi utilizado para a FIV de oócitos bovinos sem zona pelúcida (ZP) para avaliar as taxas de fecundação monospérmica e polispermica. No Experimento II, avaliou-se a resposta do sêmen equino criopreservado frente a concentrações maiores de heparina (50 e 100 UI/mL) e de cálcio ionóforo (A23187) para a indução da CE e da RA *in vitro*. A sobrevivência dos espermatozoides após o descongelamento, durante e após a incubação, a CE e a RA, foram avaliadas pelas colorações com azul de tripano-Giemsa, e com clortetraciclina (CTC), respectivamente. No Experimento I, a espécie bovina apresentou baixa mortalidade espermática após incubação (7 a 16%) e foi responsiva ao tratamento com heparina (59 a 84%), havendo diferença nas respostas dos touros frente à heparina ($p < 0,05$), conforme esperado. As espécies bubalina, equina e ovina não responderam aos tratamentos com heparina ($\leq 20\%$) e apresentaram elevada mortalidade após a incubação com heparina (18 a 77%), havendo uma correlação negativa entre as taxas de mortalidade e a proporção de espermatozoides capacitados ($p \leq 0,05$; $r = -0,70$). Já o sêmen caprino apresentou menor mortalidade (19 a 42%) e resposta moderada à heparina (14 a 31%). A FIV de oócitos bovinos sem ZP com espermatozoides bovinos após CE e RA *in vitro* resultou em maiores taxas de fecundação monospérmica (40%) e menores de polispermia (2%) em comparação à FIV convencional, com oócitos com ZP (24% e 18%, respectivamente; $p \leq 0,05$). No Experimento II, dois de cinco ganhões mostraram ser mais sensíveis à heparina (10 a 30%) e ao cálcio ionóforo (A23187) para a indução da RA *in vitro* (52 a 67%), mas com elevadas taxas de mortalidade após a incubação (49 a 74%). Contudo, o protocolo aplicado no presente trabalho resultou na indução da capacitação espermática e reação acrossômica *in vitro* do sêmen equino criopreservado.

Palavras-Chave: Fecundação *in vitro*, capacitação espermática, reação acrossômica, mamíferos.

ABSTRACT

This study aimed to determine the efficiency of a protocol for the induction of in vitro sperm capacitation and acrosome reaction in frozen semen of domestic species for use in in vitro fertilization (IVF) procedures, using bovine semen as control. In Experiment I, the effect of different heparin concentrations (5, 10 and 15 IU/mL) on the induction of in vitro sperm capacitation (SC) of frozen bovine, bubaline, ovine, caprine and equine semen was compared. The response of capacitated frozen bovine semen to calcium ionophore (A23187) for induction of in vitro acrosome reaction (AR) was also evaluated, being used for the IVF of zona-free bovine oocytes to assess monospermic and polyspermic fertilization rates. In Experiment II, the response of frozen equine semen to heparin (50 e 100 IU/mL) and calcium ionophore (A23187) for induction of in vitro SC and AR was evaluated. Sperm survival rates after thawing, incubation, SC AR were evaluated by trypan blue-Giemsa and by chlortetracycline (CTC) stains, respectively. In Experiment I, bovine semen had low sperm mortality after incubation (7 to 16%) and high response to heparin (59 to 84%), with bulls showing different responses to heparin. Buffalo, equine and ovine semen did not respond to heparin treatments ($\leq 20\%$ of capacitated cells) and showed high cell mortality after incubation (18 to 77%), with a negative correlation observed between mortality and the proportion of capacitated sperm cells ($p \leq 0,05$; $r = -0.70$). Goat semen, in turn, had moderate mortality (19 to 42%) and response to heparin (14 to 31%). The IVF of zona-free bovine oocytes with in vitro acrosome reacted bovine sperm resulted in higher monospermic fertilization rates (40%) and lower polyspermia (2%) than conventional IVF using intact oocytes (24% and 18%, respectively; $p \leq 0.05$). In Experiment II, two out of five stallions responded to heparin (10 a 30%) and to calcium ionophore to induce AR in vitro (52 a 67%), with high mortality rates after incubation (49 to 74%). However, the protocol used in the present study resulted in the in vitro sperm capacitation and acrosome reaction of cryopreserved equine semen.

Keywords: *In vitro fertilization, sperm capacitation, acrosome reaction, mammals.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** A ligação Juno-IZUMO é essencial para a fecundação e pode contribuir para o bloqueio da membrana na polispermia. A IZUMO (vermelho) é exibida na superfície do espermatozoide após reação acrossômica e interage com a Juno (verde) na superfície dos oócitos ovulados (1). Após a fecundação (2), a Juno é rapidamente eliminada da membrana do oócitos e redistribuída como vesículas, que podem se ligar e neutralizar espermatozoides reagidos subsequentes, reduzindo assim a possibilidade de criação de embriões poliploides não viáveis (Fonte: BIANCHI; WRIGHT, 2014b).....
- 41
- Figura 2.** A superfície celular Juno rapidamente se torna indetectável após a fecundação. a) O receptor Juno (verde) mostra-se bastante evidente em oócitos em metáfase II (MII), b) passando a ser pouco evidente na telófase II e c) indetectável nos zigotos no estágio pronuclear. Seta e asterisco indicam locais da primeira e da segunda extrusão dos corpúsculos polares, respectivamente; cromossomos não estão dentro do plano de foco (Fonte: BIANCHI *et al.*, 2014a).....
- 42
- Figura 3.** Zigoto bovino, derivado de oócito bovino maturado e fecundado *in vitro*. O oócito foi o primeiro maturado *in vitro* e fecundado *in vitro* com espermatozoide tratado com heparina, no início de 1984, como descrito em Parrish *et al.* (1986). Dois pronúcleos (PN) são evidenciados junto com a cauda do espermatozoide penetrante (ST). (Fonte: PARRISH *et al.*, 1986).....
- 44

Figura 4. Principais eventos durante a jornada do espermatozoide pelo trato reprodutivo feminino (Gervasi & Visconti, 2016). 1) Passagem dos espermatozoides pelo útero para a tuba uterina pela junção útero-tubárica (JUT). 2) Formação do reservatório de espermatozoides no istmo pela ligação dos espermatozoides às células epiteliais. Moléculas de ligação específicas da espécie estão envolvidas neste processo. 3) Sinais desconhecidos associados à ovulação que induzem à liberação de espermatozoides da tuba. Este acontecimento está relacionado a eventos tardios de capacitação, como motilidade hiperativada e perda de proteínas de ligação para a remodelação da membrana plasmática da cabeça do espermatozoide. 4) O espermatozoide, agora desassociado das células epiteliais, atinge a ampola e encontra o complexo *cumulus*-oócito, o acrossoma reage e fecunda o oócito (Adaptado de COY *et al.*, 2012).....

47

Figura 5. Modelo proposto de eventos intracelulares durante a capacitação de espermatozoides bovinos por heparina (Fonte: PARRISH, 2014).....

49

Figura 6. Padrões de coloração com clortetraciclina CTC de espermatozoides bovinos criopreservado, sob microscopia de epifluorescência em magnitude de 1000×. (a) Padrão NCA (células não capacitadas); (b) padrão CA (células capacitadas); (c) padrão RA (células capacitadas com acrossoma reagido). (Fonte: do autor).....

61

Figura 7. Padrões de coloração de Giemsa e azul de tripano em espermatozoides bovinos em microscópio de luz em magnitude de 1000×. a) Padrão AI

(acrossomo íntegro); b) padrão ANI (acrossomo não íntegro); c) padrão MAI (morto com acrossomo íntegro; d) Padrão MRA (morto com acrossomo reagido). (Fonte: do autor).....

Figura 8. Taxas de capacitação espermática em três touros (Touros A, B, C) após incubação por 0 h (T0) e 2 h (T2) em 5, 10 ou 15 UI/mL de heparina. ^{a-d}: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$). No eixo X são apresentadas as representações das porcentagens de espermatozoides: vivos não-capacitados (representados por barras em preto e siglas “NCA”), vivos capacitados (representados por barras em cinza-claro e siglas “CA”) e vivos reagidos (representados por barras em amarelo e siglas “RA”). No eixo Y, são apresentadas as legendas dos métodos de segregação espermática, os tempos de incubação e as distintas concentrações de heparina.....

Figura 9. Taxas de sobrevivência e capacitação espermática de sêmen bubalino, caprino, equino e ovino, incubados por 0 e 2 h em 5, 10 ou 15 UI/mL de heparina. ^{a-d}: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$). No eixo X são apresentadas as representações das porcentagens de espermatozoides: vivos não-capacitados (representados por barras em preto e siglas “NCA”), vivos capacitados (representados por barras em cinza-claro e siglas “CA”) e vivos reagidos (representados por barras em amarelo e siglas “RA”). No eixo Y, são apresentadas as legendas dos métodos de segregação espermática, os tempos de incubação e as distintas concentrações de heparina.....

Figura 10. Avaliação das configurações de cromatina em estruturas bovinas 18 h após a fecundação *in vitro* de oócitos com ou sem zona pelúcida. ^{a,b}Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$). No eixo X estão as representações das porcentagens de ativação e/ou fecundação dos oócitos com e sem zona pelúcida: oócitos partenotos (representados por barras em azul), oócitos com zona pelúcida intacta (representados por barras em cinza-claro) e sem zona pelúcida (representados por barras em preto com cinza). No eixo Y as legendas dos grupos referentes a configuração de cromatina após 18 h da ativação e fecundação *in vitro* de oócitos com ou sem zona pelúcida: cromatina em metáfase II (MII), 1 ou 2 pró-núcleos (1PN e 2PN, respectivamente), oócitos não ativados mesmo com a entrada de um ou mais espermatozoides (NA).....

75

Figura 11. Imagens representativas de oócitos ativados partenogeneticamente ou fecundados *in vitro*. a) Oócito partenoto não ativado, seta preta indica presença da cromatina em metáfase II (MII). b) Oócito partenoto ativado, seta branca indica a presença de 1 pronúcleo (PN). c) Oócito sem zona pelúcida fecundado *in vitro*, seta branca indica a presença de 2 pronúcleos (PN). d) Oócito sem zona pelúcida fecundado *in vitro*, seta cinza indica a presença de material genético do espermatozoide em descondensação, seta verde indica a cromatina em metáfase II, sem ser ativado. e) Oócito sem zona pelúcida fecundado *in vitro*, seta cinza indica a presença de material genético do espermatozoide em descondensação e em roxas não descondensadas, indicando a penetração de mais de um espermatozoide no oócito. f) Putativo zigoto em cultivo *in vitro*, Dia 2 de desenvolvimento, setas em marrom indicam um blastômero com o material genético em estágio de telófase. Microscopia de epifluorescência, em bisbenzimidida (Hoechst 33342), sob magnitude de 1000X.....

76

Figura 12. Taxas de capacitação espermática *in vitro* e viabilidade espermática do sêmen congelado de cinco garanhões (A, B, C, D, E) após incubação por 0 h (T0), 30 min e 2 h (T2) em 50 e 100 UI/mL de heparina. ^{a-d}: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$). No eixo X são apresentadas as representações das porcentagens de espermatozoides: vivos não-capacitados (representados por barras em preto e siglas “NCA”), vivos capacitados (representados por barras em cinza-claro e siglas “CA”) e vivos reagidos (representados por barras em amarelo e siglas “RA”). No eixo Y, são apresentadas as legendas dos métodos de segregação, tempos de incubação e distintas concentrações de heparina.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Compilação de resultados publicados de fecundação *in vitro* na espécie equina..... 52
- Tabela 2.** Média (%) de espermatozoides bovinos mortos, não capacitados, capacitados e reagidos após a criopreservação pelo processo de segregação e a avaliação com a coloração com azul de tripano e com CTC..... 68
- Tabela 3.** Média (%) de espermatozoides de três touros bovinos apresentando acrossoma íntegro, acrossoma não íntegro, acrossoma reagido e proporção de mortos após 0 e 2 h de incubação em 5 UI/mL de heparina, após a avaliação por coloração com azul de tripano e Giemsa..... 70
- Tabela 4.** Média (%) de espermatozoides bovinos não capacitados, capacitados e reagidos após o processo de segregação e o período da incubação com heparina 5 UI/mL após a avaliação com a coloração com CTC..... 70
- Tabela 5.** Média (%) de espermatozoides de três touros bovinos apresentando indução da capacitação com 10 UI/mL de heparina e de reação acrossômica após a incubação com diferentes concentrações de cálcio ionóforo (A23187)..... 73
- Tabela 6.** Resultados preliminares de produção *in vitro* de embriões bovinos pela avaliação de taxas de fecundação e de clivagem após ativação partenogenética de oócitos maturados intactos (com zona pelúcida) e FIV de complexos *cumulus*-oócitos maturados intactos e oócitos maturados sem zona pelúcida..... 74

Tabela 7. Avaliação das configurações de cromatina em estruturas bovinas 18 h após a fecundação *in vitro* de oócitos com ou sem zona pelúcida.....

74

Tabela 8. Média (%) de espermatozoides equinos com indução da capacitação com 100 UI/mL de heparina e da reação acrossômica após a incubação com diferentes concentrações do cálcio ionóforo (A23187).....

78

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

6-DMAP	6-dimetilaaminopurina
BSA	Albumina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
Ca ²⁺	Cálcio
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CCO(s)	Complexo cumulus-oócito
CO ₂	Dióxido de carbono gasoso
CP	Corpúsculo polar
CSF	Fator citostático (<i>Cytostatic factor</i>)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGF	Fator de crescimento (<i>epidermal growth factor</i>)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fecundação <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio Folículo estimulante
GAG	Glicosaminoglicanos
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
hpf	Horas pós-fecundação
ICSI	Injeção intracitoplasmática de espermatozoide (<i>Intracitoplasmatic sperm Injection</i>)
JUT	Junção útero-tubárica
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MP	Mini-Percoll
mPBS	Tampão fosfato-salino modificado (<i>Modified phosphate buffered saline</i>)
NL ₂	Nitrogênio Líquido
O ₂	Oxigênio gasoso
OPU	oócitos via aspiração folicular guiada por ultrassonografia (<i>Ovum pick up</i>)
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PVP	<i>Polivinilpirrolidona</i>

SFB	Soro Fetal Bovino
SOF	Fluido de Oviduto Sintético (<i>Synthetic oviductal fluid</i>)
SUZI	<i>Sub-zonal sperm injection</i>
TALP	Tyrodes com albumina, lactato e piruvato
TE	Transferência de embriões
TCM-199	Meio de cultivo de tecido (<i>tissue culture medium 199</i>)
%	Porcentagem
h	Hora
kDa	Quilodalton
M	Molar
min	Minutos
s	Segundo
UI	Unidade internacional
vs.	<i>Versus</i>
ZP	Zona pelúcida
μL	Microlitros
μM	Micromolar

1. SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	24
2.1 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	24
2.1.1 <i>Histórico da fecundação in vitro</i>	24
2.1.2 <i>Procedimentos de FIV</i>	25
2.1.3 <i>FIV em mamíferos domésticos</i>	28
2.1.3.1 <i>FIV em bovinos</i>	29
2.1.3.2 <i>FIV em suínos</i>	30
2.1.3.3 <i>FIV em pequenos ruminantes domésticos</i> <i>(ovinos e caprinos)</i>	31
2.1.3.4 <i>FIV em bubalinos</i>	31
2.1.3.5 <i>FIV em equinos</i>	32
2.1.4 <i>FIV interespecies</i>	34
2.1.5 <i>Partenogênese</i>	35
2.2 <i>Mecanismos da fecundação in vivo</i>	36
2.3 <i>Maturação, capacitação e reação acrossômica espermática</i>	43
2.4 <i>Protocolo proposto</i>	49
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS.....	54
3.1 <i>Hipóteses</i>	54
3.2 <i>Objetivo geral</i>	54
3.3 <i>Objetivos específicos</i>	54
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 <i>Local de Realização do estudo e</i> <i>Delineamento Experimental</i>	55
4.1.1 <i>Local de Realização do Estudo</i>	55
4.1.2 <i>Delineamento Experimental</i>	55
4.2 <i>Meios de Cultivo e Reagentes</i>	56
4.3 <i>Sêmen criopreservado</i>	56
4.4 <i>Processamento e segregação espermática</i>	57

4.4.1 <i>Swim up</i>	58
4.4.2 <i>Gradiente de Mini-Percoll (MP)</i>	58
4.5 Experimento I.....	59
4.6 Experimento II.....	66
4.7 Análise estatística.....	67
5. RESULTADOS.....	68
6. DISCUSSÃO.....	79
7. CONCLUSÃO.....	95
8. PERSPECTIVAS.....	96
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
10. ANEXOS.....	116

1. INTRODUÇÃO

A fecundação *in vitro* (FIV) se baseia na penetração de um oócito por um espermatozoide *ex vivo*, que por via de regra, deve suceder a capacitação espermática e a reação acrossômica (YANAGIMACHI, 1981). A técnica de FIV só foi possível após o esclarecimento do processo de capacitação espermática descrito em trabalhos independentes realizados por Austin (1951) na Austrália e Chang (1951) nos Estados Unidos da América. Após Chang (1959) e Whittingham (1968) produzirem os primeiros mamíferos pela FIV, em coelhos e camundongos, respectivamente, o primeiro procedimento bem-sucedido da FIV humana na prática clínica foi obtido com o nascimento de Louise Brown em 1978 (STEPTOE & EDWARDS, 1978). Apesar do nascimento do bovino Virgil 1981 (BRACKETT *et al.*, 1982), fruto da FIV de oócitos maturados *in vivo*, o primeiro nascimento de um animal de produção (bovino) por procedimentos totalmente *in vitro* (produção *in vitro*, ou PIV, consistindo na maturação, fecundação e cultivo *in vitro*) ocorreu há pouco mais de três décadas (LU *et al.*, 1987).

Hoje, a PIV em humanos e em certos modelos animais se encontra bem estabelecida, em especial na espécie bovina, a qual, de acordo com Parrish (2014), representa o melhor modelo para o estudo de desenvolvimento de embriões *in vitro*, relatando mais de 1000 publicações relacionadas a embriões bovinos de 2011 até 2014. O grande suprimento de oócitos bovinos, obtidos tanto de abatedouros quanto por procedimentos de coleta *in vivo* de oócitos via aspiração folicular guiada por ultrassonografia (*Ovum Pick Up*, OPU), possibilita a produção de embriões em larga escala. Contudo, este grande avanço técnico somente foi possível após a utilização de agentes capacitantes, como a heparina, adicionados aos meios de fecundação *in vitro*, promovendo a capacitação espermática *in vitro* e subsequente FIV em bovinos (PARRISH; SUSKO-PARRISH; FIRST, 1985; PARRISH, *et al.*, 1986).

A FIV na espécie equina ainda não é uma realidade devido à sua eficiência ser muito baixa e por não conferir repetitividade (ZHANG; RUTLEDGE; ARMSTRONG, 1991; PALMER *et al.*, 1991; HINRICHS, 2018). Acredita-se que a espécie equina tenha sido a primeira a ser submetida com sucesso à inseminação artificial, seja por lendas medievais, seja em tempos modernos (ALLEN, 2005). Porém, em comparação com as

demais espécies domésticas, a aplicação das biotécnicas da reprodução em equinos foi mais lenta. As principais limitações ao desenvolvimento da FIV em equinos estão relacionadas à escassa disponibilidade de ovários e oócitos, à baixa taxa de recuperação oocitária de folículos ovarianos, e à ineficiente resposta das éguas aos protocolos de superovulação (ALLEN, 2005). Em adição, uma das maiores barreiras para o sucesso da FIV na espécie equina está associada à incapacidade dos espermatozoides penetrarem na zona pelúcida, como resultado de inadequada capacitação espermática, o que resulta em uma não geração ou inadequada reação acrossômica dos espermatozoides, mesmo quando estes se ligam à zona pelúcida (TREMOLÉDA *et al.*, 2003, LEEMANS *et al.*, 2016, 2019). Também se presume a possibilidade de ocorrência do fenômeno de *zona hardening*, comum em algumas espécies de roedores, como em camundongos e ratos, o que dificulta ou impossibilita a penetração do espermatozoide através da zona pelúcida (DE FELICI; SALUSTRI; SIRACUSA, 1985; FUJII; YOSHIOKA; SASAKI, 1990; ZHANG; RUTLEDGE; ARMSTRONG, 1991; DELL'AQUILA *et al.*, 1999). Durante a manipulação do gameta feminino *in vitro*, possíveis mudanças nas proteínas da zona pelúcida podem ocorrer, tornando-a mais resistente à penetração. O fenômeno de *zona hardening* pode ocorrer por liberação prematura de grânulos corticais dos oócitos, quando em condições inapropriadas de maturação (MIV) ou cultivo *in vitro* (CIV; DE FELICI; SIRACUSA, 1982; ZHANG; RUTLEDGE; ARMSTRONG, 1991; DELL'AQUILA *et al.*, 1999; LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2001; MUGNIER *et al.*, 2009b). Este fenômeno já foi observado durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos equinos (DELL'AQUILA *et al.*, 1999). Estudos relatam que a resistência da zona pelúcida dos oócitos de camundongos pode ser prevenida com a suplementação do meio com a proteína fetuína (DELL'AQUILA *et al.*, 1999). Mesmo assim, meios suplementados com fetuína durante a manipulação de oócitos equinos não proporcionaram aumento nas taxas da FIV equina que não ultrapassam de 0 a 33% (SCHROEDER *et al.*, 1990; DELL'AQUILA *et al.*, 1999).

Na busca pela eficiência da FIV equina, diversos autores buscaram desenvolver protocolos para a capacitação dos espermatozoides, que na nossa opinião, deixaram um tanto de lado um dos aspectos importantes da fecundação, que é a reação acrossômica *per se*. No entanto, nenhum protocolo confiável e com repetitividade de fecundação *in vitro*

foi estabelecido em equinos (CHOI *et al.*, 1994; DELL'AQUILA *et al.*, 1997a, b; HINRICHS *et al.*, 2002; MUGNIER *et al.*, 2009a; SESSIONS-BRESNAHAN; GRAHAM; CARNEVALE, 2014; LEEMANS *et al.*, 2015). O uso de sistemas alternativos, como oócitos sem zona pelúcida (*zona-free oocytes*) ou técnicas de micromanipulação de gametas, como a injeção subzonal de espermatozoides (SUZI), foram utilizados para investigação de eventos relacionados ao mecanismo e fisiologia da fecundação, como a capacitação e a reação acrossômica de espermatozoides, a fusão de membranas dos gametas masculino e feminino, a ativação de oócitos e a formação de pronúcleos, normalmente em modelos interespécies, como o uso de oócitos de Golden Hamster sem zona pelúcida, para a fecundação com espermatozoides de ruminantes ou mesmo de humanos (IRITANI, 1991; YANAGIMACHI, 1981; KUMAR *et al.*, 2013). Ambos os sistemas necessitam de espermatozoides capacitados e com reação acrossômica para a fusão com a membrana plasmática dos oócitos (YANAGIMACHI, 1981; MANN, 1988).

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um protocolo para a manipulação de espermatozoides de sêmen descongelado de mamíferos domésticos de interesse zootécnico, induzindo a capacitação espermática utilizando heparina e/ou reação acrossômica utilizando cálcio ionóforo (A23187), com vistas a permitir o ancoramento/adesão do espermatozoide ao oolema, seguida da penetração e ativação do oócito, a fecundação *per se*, a formação de pronúcleos, clivagem e subsequente desenvolvimento embrionário. Buscou-se utilizar a espécie bovina como modelo para então traduzir a aplicação dos procedimentos a espécies cuja eficiência de fecundação é baixa e variável (bubalinos, caprinos, ovinos) ou mesmo ineficiente, como a espécie equina em especial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fecundação *in vitro* (FIV)

2.1.1 Histórico da fecundação *in vitro*

A fecundação *in vitro* (FIV) em mamíferos tem uma história que se inicia antes mesmo do início do século XX (FAUSER; EDWARDS, 2005). Pesquisas envolvendo embriões de roedores em cultivo por um curto período abriram novas perspectivas para estudos *in vitro* em embriões de diversas espécies. A primeira tentativa científica de FIV em mamíferos foi relatada por Schenk em 1887, quando o fenômeno da capacitação espermática ainda era desconhecido, o que acabou impedindo avanços no campo por mais de meio século (RODRIGUES; BERTOLINI, 2019). No entanto, houve várias tentativas frustradas de realizar a FIV, e algumas, presumivelmente de sucesso, que se mostraram equivocadas. A década de 1930 permitiu algum avanço, como por exemplo, o desenvolvimento de condições para promover a maturação *in vitro* de oócitos imaturos de coelho em meios de cultivo, por Gregory Pincus e seus colegas Enzmann e Saunders (FAUSER; EDWARDS, 2005). Em 1934, Gregory Pincus e Ernst Vinzenz Enzmann alegaram ter realizado a primeira FIV, em coelhos (PINCUS; ENZMANN, 1934), o que foi posteriormente contestado, levando os autores a sofrerem fortes críticas e ao ostracismo científico. O fato relevante de mudança de pensamento é que, em 1951, dois cientistas trabalhando de forma independente, Colin Russell Austin na Austrália e Min Chueh Chang nos Estados Unidos, demonstraram que espermatozoides recém-ejaculados não eram capazes de fecundar imediatamente um oócito maturo, por requererem um período de maturação no trato genital feminino, ou seja, que uma capacitação era um fenômeno necessário para a fecundação (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). Isto fez com que contestações fossem levantadas quanto à FIV realizada por Pincus e Enzmann: “Como Pincus e Enzmann tiveram nascidos vivos quando co-cultivaram espermatozoides recém-ejaculados com oócitos?” Uma possível resposta a isto é que os espermatozoides, após curto período de co-cultivo *in vitro* com os oócitos, podem ter sido levados ao

interior do trato feminino junto com os oócitos, onde capacitaram e subsequentemente fecundaram os gametas femininos (BIGGERS, 2012).

Somente em 1959 Chang realizou a FIV em coelhas, obtendo nascidos vivos (CHANG, 1959). Pouco depois, Yanagimachi e Chang (1963) realizaram a FIV com a indução da capacitação espermática *in vitro* de espermatozoides epididimários de Hamster, fornecendo as informações necessárias para posterior execução da FIV em um grande número de outras espécies animais (ROGERS, 1978; HIROSE; OGURA, 2019). Em Cambridge, David Gordon Whittingham (1968) relatou a obtenção de embriões de camundongos por FIV, e em 25 de julho de 1978, nasceu o primeiro humano a partir da FIV, a menina Louise Toy Brown (STEPTOE & EDWARDS, 1978). Em bovinos, o nascimento do primeiro terneiro por FIV ocorreu em 1981 (BRACKETT, 1982) de oócitos maturados *in vivo*, mas o primeiro nascimento de um animal de produção (bovino) por procedimentos totalmente *in vitro* (PIV) ocorreu há pouco mais de três décadas (LU *et al.*, 1987). O início da década de 1990 é acompanhada da evolução da PIV pela FIV em outras espécies domésticas de interesse zootécnico. O nascimento do primeiro ovino e bubalino obtidos após maturação, fecundação e cultivo *in vitro* ocorreu em 1991 por Czlonkowska *et al.* (1991) e Madan *et al.* (1991), respectivamente. Em equinos, o primeiro nascimento de FIV também foi obtido em 1991, por Palmer *et al.* (1991). Entretanto, este resultado nunca obteve repetitividade até o presente momento. Por fim, o primeiro caprino de PIV foi relatado em 1992 por Cognie *et al.* (1992).

2.1.2 Procedimentos de FIV

Em termos coloquiais e genéricos, utiliza-se amplamente o termo FIV como sinônimo de PIV de embriões pela FIV. Enquanto a FIV é somente uma etapa na PIV, esta envolve a produção de embriões fora do trato reprodutivo animal (SANTANA, 2012), podendo ser realizada principalmente pelas técnicas de partenogênese, fecundação *in vitro* (FIV), clonagem por transferência nuclear (TN) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Então, a PIV de embriões pela FIV envolve etapas que geralmente incluem a coleta, maturação (MIV) e fecundação (FIV) de oócitos, bem como o cultivo ou co-cultivo (CIV) de embriões e estruturas embrionárias em laboratório, ou seja, totalmente *in vitro* (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009; LIMA; SANTOS, 2010).

Outro termo erroneamente utilizado na língua portuguesa refere-se à palavra fertilização como sinônimo de fecundação, traduzido da língua inglesa. Definiu-se em 1991, durante uma reunião plenária da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE), hoje designada Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, em Curitiba, PR, que o termo correto em nosso idioma mãe é o emprego da palavra fecundação *in vitro* para a FIV. Como haveria proferido publicamente o Dr. Assis Roberto De Bem, notório pesquisador brasileiro da Embrapa e pioneiro da FIV no Brasil: “fertilização é do solo!” (informação verbal)¹.

A FIV é uma importante biotécnica de grande aplicação comercial e científica, sendo muito utilizada para estudar a interação espermatozoide-oócito, e mecanismos moleculares e celulares básicos da fecundação em mamíferos. Comercialmente, a FIV em bovinos tem sido de valor na multiplicação de animais geneticamente superiores, também impedindo o descarte precoce de fêmeas geneticamente privilegiadas que portam alterações patológicas adquiridas, e que impeçam a procriação, mesmo pela PIV de embriões (GONÇALVES *et al.*, 2007). A associação da PIV de embriões com outras técnicas, como a criopreservação, possibilita a criação de bancos de germoplasma que por sua vez promovem um melhor aproveitamento do material genético e do potencial reprodutivo de animais geneticamente superiores, assim como a preservação de raças ou linhagens de animais importantes ou que corram risco de extinção (GONÇALVES *et al.*, 2007).

Em condições fisiológicas, é necessário que o espermatozoide percorra um longo trajeto pelo trato reprodutivo da fêmea até a tuba uterina para que a fecundação do oócito ocorra *in vivo*. Ao longo deste percurso, a presença de glicosaminoglicanos (GAG) no interior do trato reprodutivo da fêmea induzem a capacitação espermática (PARRISH *et al.*, 1989; SUAREZ; PACEY, 2006; MELLO *et al.*, 2016). *In vitro*, a capacitação espermática geralmente é promovida pela heparina, um GAG presente em altas concentrações no trato reprodutivo da fêmea, em especial a bovina, durante o estro (BLONDIN *et al.*, 2009). A eficácia desta molécula em induzir a capacitação espermática *in vitro* foi observada e descrita por Parrish *et al.* (1986), com o uso do sêmen bovino

1. Informação fornecida pelo Professor Marcelo Bertolini, participante da Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Transferência de Embriões (SBTE), em Curitiba, PR, em agosto de 1991.

descongelado, adaptando o tratamento que havia sido submetido ao ejaculado bovino (PARRISH; SUSKO-PARRISH; FIRST, 1985), no qual o sêmen foi pré-incubado com heparina. Assim, os espermatozoides foram incubados por 15 min em meio contendo 10 µg/mL de heparina, e após, diluídos no meio de fecundação, contendo oócitos maturados *in vitro*. O curto tempo de incubação deve-se ao sêmen descongelado possuir uma menor sobrevivência à incubação, quando comparado ao sêmen *in natura*. Posteriormente, a heparina passou a ser adicionada a meios de fecundação *in vitro*, associado com prévia lavagem espermática, através de um gradiente descontínuo de Percoll® ou similares (PARRISH; SUSKO-PARRISH; GRAHAM, 1999). A concentração da heparina foi um ponto crítico no desenvolvimento do protocolo de FIV, pois foi observado por First e Parrish (1989) que as taxas de fecundação com espermatozoides descongelados eram dependentes da dose de heparina (PARRISH, 2014.). É possível, então, aumentar a porcentagem de oócitos fecundados, ajustando os níveis de concentração de heparina no meio de FIV. Geralmente, a concentração de heparina varia de 0,2 a 5 µg/mL, mas níveis mais altos podem ser utilizados, ajustando doses a cada reprodutor. Pode-se alterar os níveis de heparina e/ou alterar as concentrações de espermatozoides para obter resultados eficientes de fecundação, maximizando a penetração de espermatozoides nos oócitos e ao mesmo tempo minimizando a polispermia (PARRISH, 2014).

Quando se emprega sêmen descongelado faz-se necessária a utilização de métodos de seleção/segregação de espermatozoides antes da capacitação e após o descongelamento da dose de sêmen, visando a obtenção de maiores proporções de células espermáticas móveis para a FIV. Os procedimentos de seleção/segregação utilizados são capazes de melhorar significativamente a qualidade do sêmen, por selecionarem uma maior taxa de espermatozoides móveis e morfológicamente normais, e por eliminar ou reduzir substâncias indesejadas como os diluidores e crioprotetores, o plasma seminal, agentes microbianos e espermatozoides mortos (GORDON, 2003). Dentre as principais técnicas de seleção de espermatozoides, encontram-se os gradientes de centrifugação, como o de Percoll, e a técnica conhecida como *swim up* ou de migração ascendente (McCLURE; NUNES; TOM, 1989; PARRISH; SUSKO-PARRISH; GRAHAM, 1999). Dentre todos, os gradientes de Percoll são os mais utilizados nos laboratórios comerciais. Formado por partículas de sílica coloidal coberto com polivinilpirrolidona, o Percoll é

preparado em diferentes concentrações, para formar um gradiente descontínuo de duas (90, 45%) ou três fases (90, 45, 35%) para a separação espermática (GONÇALVES, *et al.*, 2002).

No entanto, a busca por uma recuperação máxima de espermatozoides viáveis a menor custo levou a várias mudanças nessa técnica ao longo dos anos (OLIVARES *et al.*, 2019). Possivelmente, a principal mudança tenha sido a diminuição no volume do gradiente de densidade, utilizando uma força de centrifugação mais alta e menor tempo de procedimento, caracterizando os protocolos de mini-Percoll (OLIVARES *et al.*, 2019). Em espécies como a bovina (MACHADO *et al.*, 2009), caprina (OLIVARES *et al.*, 2016) e ovina (OLIVARES *et al.*, 2019), foi demonstrado que a técnica de mini-Percoll poderia ser aplicada com sucesso para a seleção de espermatozoides. Machado *et al.* (2009) relataram que o uso dessa técnica não tem efeito adverso na qualidade dos espermatozoides bovinos e no desenvolvimento embrionário subsequente. Além disso, os autores obtiveram maiores taxas de clivagem e blastocistos para o mini-Percoll, quando comparado ao Percoll tradicional.

2.1.3 FIV em mamíferos domésticos

Inicialmente, os sistemas eficientes de produção *in vitro* (PIV) de embriões eram geralmente sistemas de co-cultivo *in vivo*, onde a maturação e a fecundação ocorriam *in vitro*, com o cultivo ocorrendo nas tubas uterinas de coelhas ou ovelhas (McEVOY, 2003). Posteriormente, passou-se a co-cultivar *in vitro* os embriões com células somáticas de suporte, como as células da tuba uterina (McLAREN; BIGGERS, 1958; KRISHER; PETTERS; JOHNSON, 1989; SHARIF *et al.*, 1991; MINAMI *et al.*, 1994) ou ainda utilizava-se meio condicionado por células para o CIV de embriões (SJUNNESSON, 2019), em meio de cultivo de células e em presença de soro animal (McEVOY, 2003). Gradualmente, a monocamada de células utilizada no co-cultivo *in vitro* passou a ser excluída à medida que as formulações para os meios de cultivo evoluíram. Os meios quimicamente semi-definidos ou definidos forneceram informações valiosas para nossa compreensão do impacto de várias substâncias na maturação de oócitos, na FIV e no desenvolvimento inicial dos embriões (McEVOY, 2003).

Ao longo dos anos, as biotecnologias da reprodução se desenvolveram desde procedimentos cirúrgicos invasivos até técnicas guiadas por ultrassonografia em muitas espécies animais (SJUNNESSON, 2019). A MIV ainda é um dos grandes obstáculos a ser superado na maioria das espécies; outra grande dificuldade tem sido o processo de capacitação espermática (BLOTTNER; NEHRING; TORNER, 1990). Diferentes espécies, assim como indivíduos dentro da mesma espécie, apresentam diferentes respostas a substâncias e suas concentrações na indução da capacitação espermática (BLOTTNER; NEHRING; TORNER, 1990). Moléculas como a heparina, a albumina sérica, a epinefrina, a penicilamina, a hipotaurina, a cafeína, o bicarbonato e o cálcio são algumas das substâncias que podem participar no processo de indução *in vitro* da capacitação espermática (PARRISH, 2014; FUNAHASHI, 2015). Há um grande caminho desde a MIV e a FIV de oócitos até a capacidade de produzir descendentes vivos, observando-se que desenvolvimento e produção de conhecimento sobre a FIV em algumas espécies levaram mais de 20 anos para se consolidar minimamente (SJUNNESSON, 2019). Vale ressaltar que, embora tenham sido relatados casos de FIV bem-sucedida com o nascimento de descendentes vivos em caninos e equinos, tais relatos foram poucos e de mínima repetitividade (PALMER, *et al.*, 1991; NAGASHIMA *et al.*, 2015; SJUNNESSON, 2019). O mecanismo de fecundação permanece em grande parte enigmático em mamíferos (MUGNIER *et al.*, 2009b). A maioria dos estudos que exploram o mecanismo molecular da fecundação foram restritos a uma única espécie, o camundongo, sem uma abordagem comparativa. Contudo, a identificação de divergências entre as demais espécies poderia permitir destacarmos os principais componentes do mecanismo de fecundação, com benefícios diretos à PIV de embriões.

2.1.3.1 FIV em bovinos

A PIV pela FIV em bovinos tem sido um valioso modelo para interesses científicos e comerciais (PARRISH, 2014). Desde o início do século, a indústria de PIV de embriões bovinos está se expandindo progressivamente (VIANA, 2017). De acordo com Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões (IETS), quase um milhão de embriões bovinos foram produzidos *in vitro* em todo o mundo em 2017 (VIANA, 2017). Parrish *et al.* (2014) comentam que o bovino é o melhor modelo de estudo de

desenvolvimento de embriões *in vitro*, relatando mais de 1000 publicações relacionadas a embriões bovinos de 2011 a 2014. O grande suprimento de oócitos bovinos, obtido tanto de abatedouros quanto por procedimentos de coleta de oócitos via aspiração folicular guiada por ultrassonografia, possibilita a produção de embriões na escala desejada (SOUZA; ABADE, 2019). Contudo, esse grande avanço só foi possível com o melhoramento das condições de PIV, em especial dos meios de cultivo *in vitro*, juntamente, com a adição da heparina, albumina sérica bovina (BSA) e aminoácidos aos meios de FIV e CIV, reduzindo o nascimento de animais com a *Abnormal Offspring Syndrome* (AOS) e, assim, levando a um aumento da eficiência final da PIV pela FIV (THOMPSON, 1995; HORI, 2010). Os sistemas de PIV em bovinos, apesar de apresentarem certa eficiência, ainda demandam melhorias, uma vez que, e em condições apropriadas, aproximadamente 90% dos oócitos aspirados atingem o estágio de MII (maturação nuclear), cerca de 80% são fecundados *in vitro* e, após o cultivo *in vitro*, cerca de 50% dos oócitos fecundados tornam-se blastocistos (PARRISH, 2014; LONERGAN; FAIR, 2016).

2.1.3.2 FIV em suínos

A PIV de embriões suínos ainda tem muitos problemas a serem superados antes que se possa considerar eficiente e reprodutível (SJUNNESSON, 2019). Um dos principais problemas é inerente à própria FIV, que geralmente resulta em fecundação polispermica dos oócitos. Provavelmente, a polispermia pode estar ligada a uma falha na maturação *in vitro* do oócito suíno (LEMAN; DZIUK, 1971; SUZUKI, *et al.*, 2003; GIL *et al.*, 2010). Assim como a outros fatores, como uma possível falha na reação de zona pelúcida, devido a uma incompleta exocitose dos grânulos corticais (WANG *et al.*, 1998) ou até mesmo a uma temperatura inadequada durante a FIV, visto que a espécie suína possui uma baixa tolerância a variações na temperatura (GARCÍA-MARTINÉZ *et al.*, 2019). A MIV de oócitos suínos fornece taxas relativamente altas de maturação nuclear, que variam entre 75% e 85%, mas, infelizmente, as taxas de polispermia podem variar de 50 a 70% (GIL *et al.*, 2010). No entanto, quando os oócitos são fecundados por um espermatozoide, cerca de 80% dos embriões formados podem atingir o estágio de blastocisto (GIL *et al.*, 2010).

2.1.3.3 FIV em pequenos ruminantes domésticos (ovinos e caprinos)

A PIV de embriões em ovinos e caprinos está bem estabelecida, mas as taxas de sucesso são inferiores às dos bovinos (PARAMIO; IZQUIERDO, 2016). Os primeiros cordeiros e cabritos nascidos oriundos da FIV de oócitos maturados *in vitro* ou *in vivo* foram obtidos em meados da década de 80 (HANADA, 1985; CHENG *et al.*, 1996). Alguns anos após, foi relatado o nascimento do primeiro cordeiro obtido após maturação, fecundação e cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio de mórula (CZLONKOWSKA *et al.*, 1991); enquanto o primeiro cabrito nascido por procedimento totalmente *in vitro* foi obtido por Cognie *et al.* (1992). No entanto, no início deste século ainda pouco se conhecia sobre as necessidades metabólicas de embriões de pequenos ruminantes (THOMPSON, 2000). Desde então, várias pesquisas têm procurado mimetizar *in vitro* as condições de produção *in vivo* de embriões, a fim de aprimorar a eficiência desta biotécnica, visto que as taxas de maturação *in vitro*, que se encontram entre de 70 a 80% em ambas as espécies (YOUNIS *et al.*, 1991; DESMEDT *et al.*, 1992; COGNIE *et al.*, 2003; BERNARDI, 2005), refletem em um desenvolvimento embrionário com taxas que ainda podem ser consideradas baixas, com variação de 25 a 40% em ovinos e de 7 a 55% em caprinos (COGNIE *et al.*, 2003; COCERO *et al.*, 2011). A alta variabilidade na produção de embriões *in vitro* observada entre estudos e grupos de pesquisa deve-se principalmente à qualidade heterogênea e desconhecida dos oócitos utilizados, que pioram durante a MIV, através de inadequadas maturações citoplasmática e nuclear, mas também devido ao meio de cultivo ainda não moldado para estas espécies (SHIRAZI *et al.*, 2012; ROCHA-FRIGONI *et al.*, 2014; MENCHACA *et al.* 2016). Tais fatores são de fundamental importância para o sucesso da PIV de embriões em ovinos e caprinos.

2.1.3.4 FIV em bubalinos

Desde seu início, a eficiência da FIV na espécie bubalina não evoluiu significativamente (MADAN *et al.*, 1991; SANSIÑENA; GASPARRINI, 2016). Isto deve-se a diversos problemas que ainda precisam ser resolvidos antes que a tecnologia de FIV possa ser utilizada comercialmente. O primeiro bubalino de PIV nascido vivo foi relatado em 1991, após a transferência embrionária (TE) para fêmeas receptoras de embriões (MADAN *et al.*, 1991). Posteriormente, em 2002, Gasparrini relatou uma

produção de 37 embriões *in vitro* transferíveis de uma única doadora. Em 2004, seis terneiros de búfalos nasceram vivos após a transferência de 95 embriões bubalinos de FIV vitrificados, para 55 receptoras (HUFANA-DURAN *et al.*, 2004). Na espécie bubalina, a tecnologia da FIV está se mostrando uma alternativa interessante aos programas de superovulação e de TE. A seleção de doadoras em relação à quantidade de embriões transferíveis *in vitro* parece ser uma ferramenta importante que permite alcançar bons resultados (SANSIÑENA; GASPARRINI, 2016). Embora em búfalos a PIV de embriões tenha progredido significativamente com relatos de animais nascidos (NEGLIA *et al.*, 2003; HUFANA-DURAN *et al.*, 2004; SÁ *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2004, GASPARRINI *et al.*, 2006), essa biotecnologia ainda está longe das condições de repetitividade e consistência necessárias para ser utilizada como ferramenta produtiva. A baixa eficiência em bubalinos em comparação aos bovinos parece estar relacionada a particularidades da fisiologia reprodutiva do búfalo. A PIV em búfalos apresenta taxas muito baixas de desenvolvimento embrionário ao estágio de blastocisto, que variam de 5 a 20% (ANAND *et al.*, 2008; ELAMARAN *et al.*, 2012; OBA; CAMARGOS, 2011) em comparação aos resultados da PIV em bovinos, que variam de 30 a 50% (LONERGAN; FAIR, 2016). Inúmeros fatores afetam a eficiência da FIV bubalina, como a viabilidade e o processamento do sêmen, a maturação *in vitro* dos oócitos, o ambiente *in vitro* adequado à sobrevivência de gametas, assim como o tempo da FIV e duração da co-incubação de gametas (SANSIÑENA; GASPARRINI, 2016; OHASHI *et al.*, 2017). Além disso, outras limitações são a baixa população folicular ovariana, a baixa taxa de recuperação de oócitos, e a baixa eficiência de FIV dos oócitos MIV. Visto que, o resultado da MIV de oócitos recuperados de ovários derivados de matadouros é altamente variável, o que por fim, afeta a fecundação e o desenvolvimento embrionário subsequente (HOLM *et al.*, 1999; FARIN; CROSIER; FARIN, 2001; HAMMAM *et al.*, 2010; SINGH; SHAH; TANK, 2012; OHASHI *et al.*, 2017).

2.1.3.5 FIV em equinos

Os procedimentos de FIV em equinos ainda não foram estabelecidos de forma consistente até o presente momento (HINRICHS, 2018). No entanto, a razão da FIV ser mal sucedida nessa espécie ainda é desconhecida (SESSIONS-BRESNAHAN;

GRAHAM; CARNEVALE, 2014), mas pode ser atribuída a dois principais fatores. O primeiro fator, e grande limitante para a PIV de embriões equinos é a obtenção de material biológico (gametas) em quantidade e qualidade (BERTOZZO *et al.*, 2014). Inicialmente, há uma escassa disponibilidade de ovários, devido ao baixo número de abatedouros para esta espécie. Além disto, as taxas de recuperação de oócitos são baixas, além da ineficiente resposta das éguas a protocolos de superovulação (ALLEN, 2005), e o limitado interesse dos criadores de cavalos e associações de raça em alguns locais do mundo (GALLI *et al.*, 2007). O segundo fator é inerente a problemas durante a FIV equina *per se*, os quais foram amplamente discutidos por Leemans *et al.* (2016). De um lado, acredita-se que as falhas na FIV sejam devidas a problemas na MIV e no endurecimento prematuro da zona pelúcida, fenômeno conhecido como *zona hardening*, causado pela exocitose prematura de grânulos corticais devido ao uso de meios de MIV inapropriados para a espécie (DELL'AQUILA *et al.*, 1999). Frente a isto, alguns grupos tentaram suplementar os meios de MIV com fetuína, mas não houve aumento nas taxas da FIV equina (DELL'AQUILA *et al.*, 1999; SCHROEDER *et al.*, 1990).

Por outro lado, outros autores sugerem um terceiro fator, no qual grande parte da falha da FIV equina esteja associada à inabilidade dos espermatozoides passarem pela zona pelúcida devido ao uso de protocolos ineficientes de indução da capacitação e da reação acrossômica (TREMOLÉDA *et al.*, 2003), tornando o progresso lento nesse campo. Buscando a melhora de tais protocolos de capacitação e/ou reação acrossômica em equinos, mas sem sucesso pois as taxas de FIV permaneceram reduzidas, utilizaram-se experimentalmente diversas substâncias já demonstradas funcionais em outras espécies (GRAHAM, 1996), como o cálcio ionóforo (A23187) (LI *et al.*, 1995, ALM *et al.*, 2001), heparina (LI *et al.*, 1995, ALM *et al.*, 2001), proteínas da zona pelúcida (GRAHAM, 1996), cafeína (GRAHAM, 1996), lisofosfolipídios (GRAHAM, 1996) e progesterona (TREMOLÉDA *et al.*, 2003). McPartlin *et al.* (2009) relataram que, após suplementar o meio de capacitação espermática de *Whitten* modificado com procaína, obtiveram resposta positiva na indução da hiperativação espermática e na FIV, apresentando taxa de 66% de penetração dos espermatozoides no citoplasma dos oócitos equinos. Resultados semelhantes foram relatados posteriormente por Ambruosi *et al.* (2013) e Leemans *et al.*

(2015) após o uso da procaína, embora tal prática não tenha sido, até hoje, validada de forma consistente e reprodutível.

2.1.4 FIV interespécies

No início da década de 1970, Ryuzo Yanagimachi propôs um modelo para ensaios de capacitação, e em especial, ensaios de reação acrossomal em diversas espécies mamíferas, utilizando oócitos de Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*) sem zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1972; YANAGIMACHI; YANAGIMACHI; ROGERS, 1976). A penetração *in vitro* de oócitos maduros de ratos por espermatozoides após a dissolução da zona pelúcida já havia sido descrita por Toyoda e Chang (1968). No entanto, a remoção da zona pelúcida para estudos *in vitro* foi postulado por Mintz (1962), que desenvolvia estudos de desenvolvimento inicial e eclosão em embriões mamíferos, em especial no camundongo.

De acordo com Yanagimachi (1972), a FIV de oócitos intactos de mamíferos, em todas as etapas envolvidas, é muito específica, o que significa que a fecundação de uma determinada espécie só pode ser realizada por espermatozoides da mesma espécie. A zona pelúcida (ZP) dos oócitos é a principal barreira que impede a fecundação entre as espécies, pois é o maior sítio de especificidade. Ao remover esta barreira, a especificidade de fecundação pode ser reduzida, mas não eliminada (HANADA; CHANG, 1972). Em algumas espécies, como por exemplo, o camundongo e o rato, mesmo removendo a ZP, a especificidade é pouco reduzida, havendo um bloqueio da fecundação com o uso de espermatozoides de espécies diferentes (HANADA; CHANG, 1972; YANAGIMACHI, 1972). Frente a isso, foi observado que havia necessidade dos espermatozoides estarem capacitados e com a reação acrossômica induzida para que houvesse a adesão e a penetração dos oócitos sem ZP (YANAGIMACHI; YANAGIMACHI; ROGERS, 1976; YANAGIMACHI, 1981). Uma particularidade dos oócitos de Golden Hamster, é que o bloqueio à polispermia depende de forma majoritária da reação da ZP induzida pelos grânulos corticais; uma vez removendo a ZP desses oócitos, há uma redução na seletividade dos gametas (YANAGIMACHI, 1984). De acordo com Yanagimachi e Rogers (1976), o Golden Hamster é excepcional neste sentido, e um fato muito interessante deste modelo é que após a fecundação (por

exemplo, com espermatozoides humanos), ocorre a formação de pronúcleos, extrusão do segundo corpúsculo polar e, por fim, a clivagem embrionária até o estágio de 2 células, claramente demonstrando que vários destes mecanismos são conservados filogeneticamente. Ainda hoje, esse modelo é utilizado em medicina veterinária para ensaios de fecundação em diversas espécies, cuja eficiência da fecundação *in vitro* ainda é muito baixa (PAVLOK, 1979; LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2001; VAJTA; RIENZI; BAVISTER, 2010; VELÁSQUEZ *et al.*, 2013).

2.1.5 Partenogênese

A partenogênese é definida como a produção de um embrião a partir do gameta feminino sem a contribuição do gameta masculino, com ou sem o desenvolvimento de um indivíduo (BEATTY, 1957; BREVINI; GANDOLFI, 2008). Este tipo de reprodução é bastante comum em algumas espécies de insetos como moscas, formigas e abelhas, assim como em alguns vertebrados como lagartos, peixes, anfíbios, cobras, e entre outros organismos (HIPPI; ATALA, 2004; BREVINI; GANDOLFI, 2008; PAFFONI *et al.*, 2008).

Nos mamíferos, essa forma de reprodução não é espontânea, mas pode ser mimetizada *in vitro* com o uso de substâncias ativadoras que simulam a função fisiológica do espermatozoide em elevar a concentração de Ca^{2+} no citoplasma dos oócitos resultando na ativação oocitária *per se*. Os oócitos da maioria dos mamíferos se encontram em MII quando ovulados ou após a maturação *in vitro* e assim permanecem até que ocorra a ativação induzida pelo espermatozoide ou por um estímulo artificial (KÜPKER; DIEDRICH; EDWARDS, 1998; MÉO *et al.*, 2007). No processo da fecundação, o espermatozoide é o ativador natural dos oócitos e sua penetração induz picos intracelulares de cálcio (FERRER-BUITRAGO *et al.*, 2018). Esses picos de cálcio promovem a inativação do fator promotor da maturação (MPF), do fator citostático (CSF) e da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK; COLLAS; SULLIVAN; BARNES, 1993; PERECIN *et al.*, 2007; RASCADO *et al.*, 2010; FERRER-BUITRAGO *et al.*, 2018), implicando na retomada da meiose, extrusão do segundo corpúsculo polar e formação dos pronúcleos (DUCIBELLA; SCHULTZ; OZIL, 2006; CLIFT; SCHUH, 2013).

Nos embriões ativados partenogeneticamente (partenotos), não ocorre a separação das cromátides e o pronúcleo é formado a partir da descondensação dos cromossomos em MII, acarretando a diploidia (MÉO, 2002). Entretanto, os partenotos apresentam falhas na expressão de alguns genes importantes, devido à origem exclusiva do material genético materno, que acaba comprometendo todo o desenvolvimento do concepto (URANGA; ARÉCHAÇA, 1997; VAN DE VELDE *et al.*, 1999; CAMPANHA, 2012).

A ativação partenogenética pode ser feita com o uso de agentes ativadores químicos (Cálcio ionóforo A23187, ionomicina, cloreto de estrôncio, etanol) ou por ativadores físicos (estimulação elétrica; LIU; TRIMARCHI; KEEFE, 2002; PAFFONI *et al.*, 2008; RASCADO *et al.*, 2010). Frequentemente, na partenogênese há a associação entre os agentes ativadores com inibidores da síntese proteica, como a ciclohexamida (VARGA *et al.*, 2008; ABDALLA *et al.*, 2009), ou com inibidores da fosforilação, como 6-dimetilaminopurina (6-DMAP; SUSKO-PARRISH *et al.*, 1994; MISHRA; MISRA; SHARMA, 2008), garantindo a manutenção do MPF em níveis basais até a primeira divisão mitótica (ALBERIO *et al.*, 2004).

A partenogênese tem sido empregada como modelo para estudos de eventos bioquímicos e morfológicos que ocorrem durante o desenvolvimento embrionário inicial. Assim como modelo para a otimização de metodologias empregadas na transferência nuclear como protocolos de ativação de oócitos (SHEN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008; DE MACEDO *et al.*, 2019). Além disso, os oócitos partenogeneticamente ativados são frequentemente empregados em experimentos de clonagem como controles das condições de manipulação, tais como meio de manutenção, temperatura ambiente, metodologia e sistema de ativação, sistemas de cultivo e qualidade intrínseca dos oócitos (SHEN *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008).

2.2 Mecanismos da fecundação *in vivo*

Os espermatozoides adquirem a capacidade fecundante durante seu trajeto pelo trato reprodutivo feminino. Ou seja, quando colocados em contato os gametas recém-ejaculados são incapazes de fecundar um oócito maturo (AUSTIN, 1951; CHANG,

1951). Tal capacidade adquirida de fecundar é chamada de capacitação espermática. Este fenômeno pode ser induzido *in vitro*, sob diferentes condições experimentais. A capacitação varia entre as espécies quanto ao tempo necessário para que o fenômeno ocorra (BRANNIGAN; LIPSHULTZ, 2008). De acordo com Yanagimachi (1981) este período de tempo depende, por exemplo, do estado fisiológico (hormonal) da fêmea, do meio ao qual os espermatozoides são expostos e do ejaculado. Em humanos, por exemplo, há variações de tempo de capacitação dos espermatozoides entre homens.

De acordo com (LEEMANS *et al.*, 2019) a base bioquímica da capacitação ainda não é bem compreendida, mas sabe-se que ocorre incorporações e modificações de várias substâncias na superfície da membrana, tornando-os incapazes de fecundar. Esse fenômeno é chamado de descapacitação espermática. Os espermatozoides sem a capacitação são incapazes de sofrer a reação acrossômica, fenômeno essencial para a transposição da ZP, revestimento glicoproteico do oócito (YANAGIMACHI, 1972).

Em camundongos, a ZP é constituída por três glicoproteínas, a ZP1, a ZP2, e a ZP3 (BLEIL; WASSARMAN, 1980). Hoje sabe-se que, dependendo da espécie mamífera, a ZP pode possuir até quatro glicoproteínas (IZQUIERDO-RICO *et al.*, 2009). Assim, a ZP de caninos, felinos, bovinos, suínos e leporinos compreende três glicoproteínas (ZP2, ZP3, e ZP4), enquanto a ZP de humanos, primatas não humanos, ratos e do hamster compreende quatro: ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4 (GOUDET *et al.*, 2008; IZQUIERDO-RICO *et al.*, 2009). A ZP1 é uma glicoproteína estrutural que promove a ligação das demais glicoproteínas e dá estrutura à ZP. A ZP3, quando ligada à superfície do espermatozoide capacitado, desencadeia a reação acrossômica, expondo assim ligantes da ZP2, que ancora os espermatozoides e permite a penetração destes na ZP (GREEN, 1997, SENGER, 2012). A glicoproteína ZP4 é codificada como uma glicoproteína de origem paráloga à ZP1 (HUGHES; BARRATT, 1999).

Ao entrarem em contato com a ZP3 do oócito na ampola da tuba uterina, a membrana externa do acrossomo e a membrana plasmática de espermatozoides capacitados sofrem fusões múltiplas, chamadas de reação acrossômica, expondo enzimas acrossomais ao ambiente (YONEZAWA, 2014). Acredita-se que certas enzimas liberadas (por exemplo, hialuronidase) despolarizem a matriz extracelular formada pelo *cumulus*, auxiliando na passagem dos espermatozoides pelo *cumulus oophorus*. Também, acredita-

se que enzimas denominadas acrosinas dissolvam a ZP, auxiliando assim na passagem das células espermáticas (YANAGIMACHI, 1981). Entretanto, a presença das enzimas acrossômicas parece não ser essencial para a fecundação, e sim complementar (YANAGIMACHI, 1994). De acordo com Yanagimachi (1981) a partir da reação acrossômica, os espermatozoides capacitados expõem proteínas integrais, pelo menos de duas formas. De um lado, há a exposição da proteína ligante da ZP2, que permite a passagem pela ZP (GADELLA, 2011). De outro lado, proteínas importantes para o ancoramento e fusão do espermatozoide ao oolema, que estão no interior do acrossoma, são translocadas e fixadas na região equatorial da célula. Após a capacitação por influência do meio, os espermatozoides aumentam o vigor do movimento, que é denominado hiperativação, que tem como objetivo fornecer um forte poder mecânico para a transposição da ZP (BUFFONE, 2016).

Uma vez ultrapassada a ZP, o espermatozoide se ancora e funde com a membrana plasmática do oócito. Em condições fisiológicas, preconiza-se que o espermatozoide que esteja prestes a se fundir tenha completado a reação acrossômica (YANAGIMACHI, 1981), condição necessária para a penetração na ZP e fusão ao oócito; caso contrário, não há fusão entre os gametas masculino e feminino (YANAGIMACHI; ROGERS, 1976). De acordo com Yanagimachi (1972) espermatozoides com acrossoma intacto, capacitados ou não capacitados, quando colocados com oócitos sem zona pelúcida, possuem a capacidade de adesão à superfície do gameta feminino, mas sem a ocorrência da fusão de membranas. O autor ainda destaca que a reação acrossômica processa a membrana plasmática do espermatozoide, mais especificamente, a membrana plasmática sobre o segmento equatorial do acrossoma, na qual as proteínas integrais de fusão estão expostas, e a região anterior ao pós-acrossoma, a qual não está diretamente envolvida na reação acrossômica, sendo capaz de se aderir e fundir com a membrana do oócito.

O mecanismo de adesão e fusão entre os gametas é intermediado por diversas proteínas que interagem entre si. As proteínas no espermatozoide são realocadas para a região equatorial pouco antes ou durante a ocorrência da reação acrossômica. As proteínas descritas como contribuintes da adesão e fusão do espermatozoide ao oócito foram denominadas de proteínas ADAMs (ADAM1, ADAM2 e ADAM3) e IZUMO1, localizadas nos espermatozoides, e as VLA-6 ($\alpha 6\beta 1$), CD9 e Juno (receptor de folato 4,

Folr4), localizadas na membrana plasmática dos oócitos (OKABE *et al.*, 1988; BLOBEL *et al.*, 1992; BARCLAY; BROWN, 1997; CHEN *et al.*, 1999; BIANCHI *et al.*, 2014a). A proteína ADAM2 possui um domínio desintegrina e metaloprotease. O domínio desintegrina confere a capacidade dessa proteína de se ligar a proteínas de membrana integrais, conhecida como integrinas. A ADAM2, ao ser exposta após a reação acrossômica, interage com duas proteínas de membrana presente no oócito, a VLA-6 ($\alpha\beta 1$) de forma direta, e indiretamente com a proteína CD9 e a actina (ANIFANDIS *et al.*, 2014). A integrina $\alpha 6$, em combinação com a subunidade integrina $\beta 1$, formam a integrina VLA-6 ($\alpha\beta 1$), as quais foram reconhecidas na superfície dos oócitos em testes usando bloqueio com anticorpo, no qual foi encontrada uma inibição de 96% do processo de fusão (ZIYYAT *et al.*, 2006; BARCLAY; BROWN, 1997). As integrinas pertencem à família de moléculas de adesão celular, que além desta atividade, também são reconhecidas como moléculas de sinalização capazes de realizar a transdução de mensagens do ambiente externo para o meio intracelular. Tal função cabe a sua estrutura molecular, com os domínios citoplasmáticos das subunidades α e β das integrinas, sendo capazes de interagir com o citoesqueleto de diferentes modos, e assim, proporcionar uma variedade de respostas celulares que poderiam ser iniciadas por meio da ligação com um ligante (JONES; WALKER, 1999). A molécula CD9 faz parte da superfamília de tetraspanina, as quais são introduzidas como "redes de tetraspanina" na membrana plasmática do oócito, formando uma "rede" multi-molecular, uma característica comum a todas as tetraspaninas (BOUCHEIX *et al.*, 1991). Assim, tais proteínas passam a interagir com outras proteínas da membrana plasmática do oócito. A molécula CD9 contém quatro domínios transmembranares, separados em dois domínios extracelulares de tamanho desigual (BOUCHEIX *et al.*, 1991; RUBINSTEIN, 1996). Esta interação confere a adesão/ancoramento do espermatozoide à membrana do oócito (ANIFANDIS *et al.*, 2014).

A fusão entre os gametas é mediada pela interação da proteína IZUMO1 com a proteína conhecida como receptor Juno (receptor de folato 4, Folr4). A proteína IZUMO1 possui aproximadamente 56 kDa e é membro da superfamília da imunoglobulina (Ig) específica dos testículos. Ela é codificada como uma proteína transmembranaral com um domínio extracelular Ig, com uma única região transmembrana e uma cauda

citoplasmática curta. A proteína IZUMO1 migra da cabeça anterior do espermatozoide para o segmento equatorial durante a reação acrossomal (INOUE *et al.*, 2005). A presença de CD9 parece também ajudar em tal processo, interagindo de forma indireta com as proteínas Juno e IZUMO1 (ANIFANDIS *et al.*, 2014).

O espermatozoide, ao se ancorar no oolema do oócito, desencadeia a despolarização da membrana plasmática pelo influxo de cálcio, e esta despolarização, por si, previne o ancoramento e fusão de outro espermatozoide neste intervalo de tempo, fenômeno conhecido como bloqueio de membrana (YANAGIMACHI, 1981). Além disso, o espermatozoide, ao se ligar à integrina de membrana, e o aumento do Ca^{2+} subsequente parecem levar à uma reorganização do citoesqueleto de actina do córtex do oócito que permite o acesso dos grânulos corticais à membrana que, em conjunto com a despolarização pelo cálcio, leva a uma cascata de eventos que culminam com a exocitose dos grânulos corticais, liberando diversas enzimas na região perivitelínica (HOODBHOY; TALBOT, 1994; GROSS *et al.*, 2000). Tais enzimas interagem com a ZP, levando a uma clivagem em um dos domínios da ZP2, onde o espermatozoide se ancora para a penetração, bloqueando a passagem e penetração de outro espermatozoide, fenômeno esse chamado de reação de zona. Tal endurecimento (*zona hardening*) é causada pela enzima ovoperoxidase (KURASAWA; SCHULTZ; KOPF, 1989). Ainda, há a liberação de diversas proteases pelos grânulos corticais que estão envolvidas com modificações na superfície da membrana do oócito, que modifica estruturalmente proteínas de ancoragem e fusão dos espermatozoides (HORVATH *et al.*, 1993). Desta forma, há certo bloqueio duplo de polispermia que ocorre em torno de 8 a 15 min após a fecundação do oócito e perdura por até 1 hora (STEWART-SAVAGE; BAVISTER, 1991; TAHARA *et al.*, 1996). No entanto, Bianchi *et al.* (2014a) sugerem outro mecanismo de bloqueio à polispermia. Estes autores observaram que os oócitos de *Mus musculus domesticus* em metáfase II (MII) apresentam uma grande quantidade do receptor Juno na membrana plasmática. Porém, quando o oócito é fecundado, há uma redução significativa deste receptor na membrana plasmática, o qual é liberado ao espaço perivitelínico sob a forma de vesículas que podem se ligar e neutralizar rapidamente o espermatozoide que reage com o acrossoma subsequente, reduzindo assim a possibilidade de criação de embriões poliplóides não viáveis (Figura 1). Tal processo é acompanhado

pela diminuição do receptor para uma forma quase inexistente após 1 h da fecundação, sugerindo que este mecanismo auxilia no bloqueio à polispermia, inibindo, assim a fusão de mais de um espermatozoide com o oócito (Figura 2). Tais estudos estão de acordo com o que Satouh *et al.* (2012) descreveram sobre a dinâmica de fusão das membranas do espermatozoide com o oócito, que transcorre em aparentemente o mesmo período de tempo. No entanto, o mecanismo preciso usado para o bloqueio da polispermia parece depender da espécie. Os oócitos de algumas espécies dependem quase que exclusivamente do bloqueio da membrana (por exemplo, o coelho), enquanto em outras, pode haver o bloqueio tanto da membrana quanto da reação da zona para prevenir a polispermia (por exemplo, o camundongo; YANAGIMACHI, 1981).

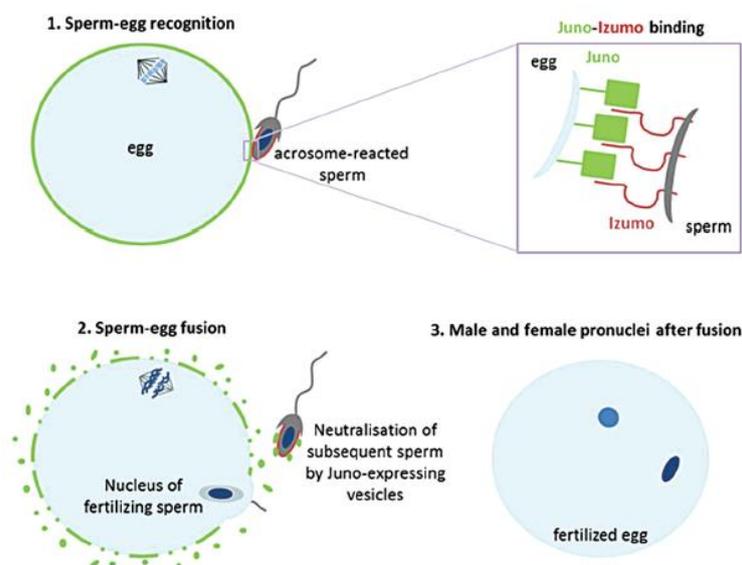


Figura 1. A ligação Juno-IZUMO é essencial para a fecundação e pode contribuir para o bloqueio da membrana na polispermia. A IZUMO (vermelho) é exibida na superfície do espermatozoide após reação acrossômica e interage com a Juno (verde) na superfície dos oócitos ovulados (1). Após a fecundação (2), a Juno é rapidamente eliminada da membrana do oócitos e redistribuída como vesículas, que podem se ligar e neutralizar espermatozoides reagidos subsequentes, reduzindo assim a possibilidade de criação de embriões poliploides não viáveis (Fonte: BIANCHI; WRIGHT, 2014b).

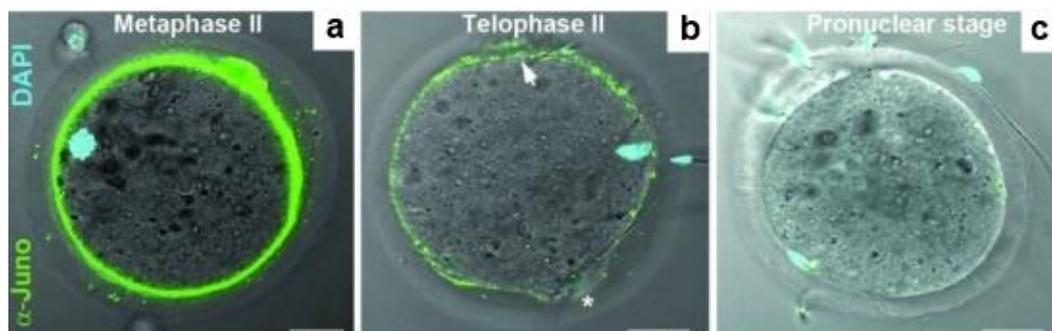


Figura 2. A superfície celular Juno rapidamente se torna indetectável após a fecundação. a) O receptor Juno (verde) mostra-se bastante evidente em oócitos em metáfase II (MII), b) passando a ser pouco evidente na telófase II e c) indetectável nos zigotos no estágio pronuclear. Seta e asterisco indicam locais da primeira e da segunda extrusão dos corpúsculos polares, respectivamente; cromossomos não estão dentro do plano de foco (Fonte: BIANCHI *et al.*, 2014a).

Antes da entrada do espermatozoide, o oócito é diploide, estagnado em metáfase da segunda divisão meiótica; com a entrada do núcleo haploide do espermatozoide aumenta a ploidia. Com a ativação, resume-se a meiose II e ocorre a extrusão do segundo corpúsculo polar (CP), tornando a estrutura diploide (Figura 3), agora chamada de zigoto (MOORE; PERSAUD, 2008). A fusão das membranas introduz o conteúdo espermático no ooplasma, o que desencadeia a ativação do citoplasma do oócito pela ação da fosfolipase C zeta (PLC ζ) (FUJIMOTO *et al.*, 2004; GONZALEZ-GARCIA *et al.*, 2013), que leva a picos regulares e repetidos de cálcio citosólico, que por sua vez desencadeiam distintas cascatas de eventos que conduzirão ao desenvolvimento embrionário subsequente (CIBELLI *et al.*, 2013; FERRER-BUITRAGO *et al.*, 2018). Com a fusão, o oócito se encontra momentaneamente triploide, contendo o conteúdo haploide do espermatozoide e a placa metafásica e figuras meióticas subsequentes no ooplasma, passando a ser chamado de oótide por um curto período, até a extrusão do segundo CP (SENGER, 2012; CLIFT; SCHUH, 2013). A formação de pronúcleos demanda um tempo após a extrusão do CP, quando ocorre a remodelação da cromatina e se dá início à reprogramação epigenética. No citoplasma do oócito, o espermatozoide perde o envelope nuclear e a cromatina começa a descondensar, havendo em especial a substituição das protaminas por histonas de origem oocitária (MONTANARI, 2013). Então, após a

remodelação da cromatina e o rearranjo cromossômico, e após a formação subsequente dos pronúcleos, a síntese de DNA e a duplicação de cromossomos nos pronúcleos masculino e feminino ocorrem de forma mais ou menos sincronizada (YANAGIMACHI, 1981). A ativação e o rearranjo dos sistemas do citoesqueleto levam à formação dos fusos acromáticos, que arrastam os cromossomos de ambos os gametas um próximo ao outro. Logo, os pronúcleos se aproximam, seus envelopes se desintegram e seus cromossomos se misturam no final da primeira clivagem, quando pela primeira vez estarão dentro de um mesmo núcleo, marcando o final da singamia (YANAGIMACHI, 1994).

2.3 Maturação, Capacitação e Reação Acrossômica Espermática

O espermatozoide adquire a capacidade de fecundar um oócito após passar por dois processos de maturação (BUFFONE, 2016). O primeiro ocorre no epidídimo, conhecido como maturação epididimária. Já o segundo ocorre após a ejaculação, durante o trânsito do espermatozoide pelo trato reprodutivo da fêmea, conhecido como capacitação espermática (BUFFONE, 2016). A capacitação, em termos fisiológicos, é definida como uma soma de modificações biofísicas e bioquímicas que levam a alterações no padrão de motilidade dos espermatozoides, conhecido como hiperativação, e à habilidade de reconhecer e ligar-se a ZP3 desencadeando a reação acrossômica que permite a passagem pela zona pelúcida e, subsequentemente, fusionar-se com o citoplasma do oócito (PARRISH; SUSKO-PARRISH; GRAHAM, 1999; MOORE; AKHONDI, 1996).

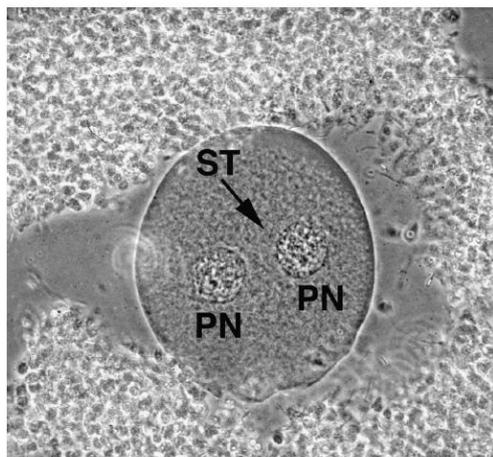


Figura 3. Zigoto bovino, derivado de oócito bovino maturado e fecundado *in vitro*. O oócito foi o primeiro maturado *in vitro* e fecundado *in vitro* com espermatozoide tratado com heparina, no início de 1984, como descrito em Parrish *et al.* (1986). Dois pronúcleos (PN) são evidenciados junto com a cauda do espermatozoide penetrante (ST). (Fonte: PARRISH *et al.*, 1986).

A capacitação espermática foi observada pela primeira vez por Austin e Chang, em 1951, como já descrito. Os autores demonstraram que os espermatozoides não possuíam a capacidade de fecundar um oócito logo após serem ejaculados, requerendo um período de maturação no trato genital feminino (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). Tais observações foram importantes para o desenvolvimento das futuras técnicas de fecundação *in vitro* empregadas em diferentes espécies mamíferas (CHANG, 1959; YANAGIMACHI; CHANG, 1963; WHITTINGHAM, 1968; STEPTOE & EDWARDS, 1978; BRACKETT *et al.*, 1982).

A maturação epididimária do espermatozoide é um processo complexo que envolve eventos que ocorrem no epitélio seminífero, durante a migração pelos túbulos seminíferos e principalmente pelo epidídimo. Durante esse processo de maturação, também ocorre a migração da gota citoplasmática, o remodelamento acrossomal, modificações na cromatina nuclear, em organelas e a fusão de epididimossomas (HERMO *et al.*, 2010; ROBAIRE; HINTON, 2015). Os espermatozoides, ao entrarem em contato com o plasma seminal (glicoproteínas ou polipeptídeos, incluindo fatores descapacitantes), sofrem incorporações e modificações de várias substâncias na superfície

da membrana, tornando-os incapazes de fecundar (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; LEEMANS *et al.*, 2019).

Após a ejaculação, no trato genital feminino ou *in vitro*, iniciam a fase final da maturação pós-testicular chamada de capacitação espermática (BUFFONE, 2016). A capacitação espermática é de grande importância, pois os espermatozoides acabam tornando-se aptos a ligarem-se aos receptores específicos presentes na ZP e assim fecundarem o oócito. *In vivo*, este processo de capacitação ocorre devido à remoção dos componentes descapitantes, no qual não há modificações morfológicas na célula, mas bioquímicas, que resultam na desestabilização da membrana plasmática, aumentando a fluidez da mesma e levando à hiperativação, os quais são processos essenciais para que ocorra a reação acrossômica e a penetração do espermatozoide no oócito. Durante este trajeto, os espermatozoides se ligam às criptas do istmo, próximo à junção útero-tubárica (JUT), somente se desprendendo após estarem capacitados, hiperativos e aptos à reação do acrossoma (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008), conforme ilustrado na Figura 4.

A tuba uterina confere um adequado microambiente para o transporte, armazenamento e capacitação dos espermatozoides, e fecundação e cultivo embrionário (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). O fluido tubárico intraluminal possui composição diferente do plasma referente à composição iônica, pH, osmolaridade e macromoléculas. O pH é levemente alcalino, em torno de 7,6, e os níveis de bicarbonato variam entre 35 e 90 mM, sendo mais elevado que no sangue venoso, além de ser rico em proteínas. O fluido tubárico varia em volume e composição entre as espécies, e de acordo com o estágio do ciclo estral, sofre influência hormonal (LEESE, 1988; HUGENTOBLE *et al.*, 2004; ZHOU; WANG; CHAN, 2005). O fluido tubárico também apresenta GAGs não sulfatados, como o ácido hialurônico, ou sulfatados (S-GAGs), como por exemplo o sulfato de condroitina, sulfato de dermatano, sulfato de queratina, e sulfato de heparan e a heparina (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

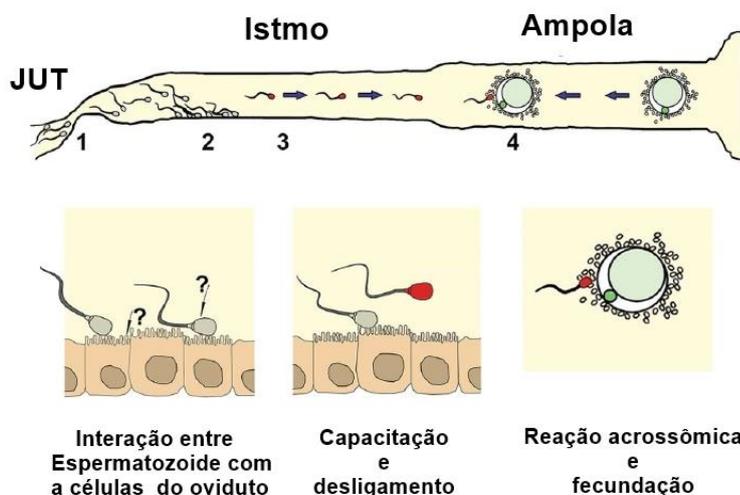


Figura 4. Principais eventos durante a jornada do espermatozoide pelo trato reprodutivo feminino (Gervasi & Visconti, 2016). 1) Passagem dos espermatozoides pelo útero para a tuba uterina pela junção útero-tubárica (JUT). 2) Formação do reservatório de espermatozoides no istmo pela ligação dos espermatozoides às células epiteliais. Moléculas de ligação específicas da espécie estão envolvidas neste processo. 3) Sinais desconhecidos associados à ovulação que induzem à liberação de espermatozoides da tuba. Este acontecimento está relacionado a eventos tardios de capacitação, como motilidade hiperativada e perda de proteínas de ligação para a remodelação da membrana plasmática da cabeça do espermatozoide. 4) O espermatozoide, agora desassociado das células epiteliais, atinge a ampola e encontra o complexo *cumulus*-oócito, o acrossoma reage e fecunda o oócito (Adaptado de COY *et al.*, 2012).

A desestabilização da membrana plasmática dos espermatozoides durante a capacitação pode levar à morte celular, caso este não esteja próximo ao oócito. A ocorrência da morte celular está ligada ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) no interior da célula, que acaba promovendo a lipoperoxidação de membrana espermática (BURNAUGH; SABEUR; BALL, 2007). Deste modo, os componentes da tuba devem favorecer a desestabilização da membrana seletivamente para preparar a célula espermática para a interação dos gametas, mantendo assim, as propriedades necessárias para o espermatozoide fecundar o oócito após a ovulação. Acredita-se que esta modulação não seja uma característica do espermatozoide, mas sim um exato controle da tuba uterina (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

A capacitação espermática envolve uma série de eventos, tais como a remoção do colesterol da membrana plasmática, aumentando a fluidez da membrana, também

permitindo o transporte de íons (cálcio e bicarbonato), com o aumento das concentrações intracelulares (VISCONTI *et al.*, 2011). Também ocorrem sinalizações intracelulares por meio de segundo mensageiros, migração das proteínas de membrana, produção de EROS, exteriorização de receptores, alterações em fosforilação e atividade da proteína quinase A (PKA) que leva ao aumento na concentração de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP; YANAGIMACHI, 1981; ARCELAY *et al.*, 2008; KRAPF *et al.*, 2010).

O processo de reação acrossômica é cálcio-dependente, pois quando há um influxo de cálcio ocorre a fusão da membrana externa do acrossomo com a membrana plasmática do espermatozoide em vários pontos. Nesses locais, as membranas rompem-se, liberando as enzimas do acrossomo (CHENG *et al.*, 1996) e a exposição de receptores de membrana, os quais são requeridos para a penetração do espermatozoide através da zona pelúcida e para a fusão com o oócito (ESTEVES *et al.*, 2007).

Várias enzimas acrossomais já foram descritas e conferidas suas funções, após a reação acrossomal, conforme já discutido acima. A hialuronidase, por exemplo, degrada o ácido hialurônico, um GAG da matriz extracelular da *corona radiata*. A protease acrosina, situada na membrana acrossômica interna, fica exposta e digere as glicoproteínas da zona pelúcida (MONTANARI, 2013). Tais enzimas parecem não ser essenciais para a fecundação, e sim complementares, uma vez que foi observada a manutenção da fertilidade e da fecundação inalterada em camundongos *knockout* (KO) para acrosina (ADHAM; NAYERNIA; ENGEL, 1997). Os movimentos da cauda também contribuem para a passagem dos espermatozoides pela *corona radiata* e pela zona pelúcida, em uma hipermotilidade.

A capacitação e a reação acrossômica espermática podem ser mimetizadas *in vitro*, permitindo estudos detalhados, dos quais se coletou a maior parte de nosso conhecimento atual sobre os mecanismos e cinética desses processos (YANAGIMACHI, 1994). Os espermatozoides capacitados *in vitro* são dotados de várias habilidades que encontramos *in vivo*, incluindo a penetração nas camadas de células do *cumulus* e a ligação às glicoproteínas da ZP que provoca a ocorrência da reação do acrossoma. Para atingir tais padrões, os espermatozoides devem ser separados das proteínas descapacitantes, essas provindas da cauda do epidídimo e do plasma seminal, como mencionado acima. Assim, tal remoção é realizada *in vitro* por centrifugação da

suspensão espermática ou pelo uso de gradientes de densidade descontínua de sílica, conhecido como Percoll (RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

Para a indução da capacitação e a reação do acrossoma *in vitro* é necessário o emprego de diferentes meios, com características semelhantes ao fluido tubárico, levando-se em consideração as particularidades da espécie. Nos espermatozoides de suínos, o bicarbonato e a albumina sérica bovina (BSA) são importantes indutores de capacitação (HARRISON; GADELLA, 2005; HARRISON, 2004), enquanto que a heparina desempenha um papel semelhante nos espermatozoides bovinos, através da ativação de várias vias intracelulares (PARRISH *et al.*, 1986; VISCONTI; KOPF, 1998). Demonstrou-se que a reação acrossômica *in vitro* é induzida tanto pela zona pelúcida solubilizada, quanto pelo uso do cálcio ionóforo (A23187) (BYRD, 1981; BERGER, 1989; SPINDLER *et al.*, 2004).

Os GAGs são moléculas importantes para processo de capacitação espermática, como mencionado anteriormente. Dentre estes, o mais importante e mais usado é a heparina. Para melhor entendimento sobre a atuação da heparina, Parrish (2014) sugeriu que ela atua na capacitação espermática se ligando às proteínas de ligação do plasma seminal, conhecidas como BSPs, que cobrem os espermatozoides durante a ejaculação. Estas proteínas incluem a BSP-A1, a BSP-A2, a BSP-A3 e a BSP-30-KDa. Tais proteínas interagem com o colesterol e fosfolípídeos na membrana plasmática dos espermatozoides. Após a ligação com a heparina, há uma perda na ligação da lectina dos espermatozoides, iniciando a perda de componentes de superfície do espermatozoide (MAHMOUD; PARRISH, 1996; MEDEIROS; PARRISH, 1996). As mudanças nos componentes de superfície provavelmente estão relacionadas à perda de BSPs induzidas pela heparina ao longo do tempo que conduzem a uma perda de colesterol e fosfolípídeos de membrana (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002), além de mudanças no pH intracelular, Ca^{2+} intracelular (Ca_i^{2+}) e nos níveis de AMPc. Além disto, o cálcio também exerce papel importante na capacitação espermática, pois a capacitação com heparina requer a internalização de cálcio extracelular, levando a um aumento de cálcio intracelular na cabeça do espermatozoide (HANDROW; FIRST; PARRISH, 1989; PARRISH; SUSKO-PARRISH; GRAHAM, 1999). Por fim, um mínimo de 10 mM/L de bicarbonato é

necessário na capacitação, já que o espermatozoide também contém uma adenilato-ciclase solúvel, presente no citoplasma, que é estimulada pelo bicarbonato.

In vitro, a albumina sérica bovina (BSA) está quase sempre presente nos meios de fecundação e capacitação *in vitro*. A BSA é um acceptor de colesterol que não se faz necessária para induzir a capacitação junto com heparina, mas é necessária para que os espermatozoides bovinos capacitados possam realizar a reação acrossômica. Um modelo que abrange todo o observado sobre os efeitos da heparina no espermatozoide bovino e na capacitação espermática é apresentado na Figura 5 (PARRISH 2014).

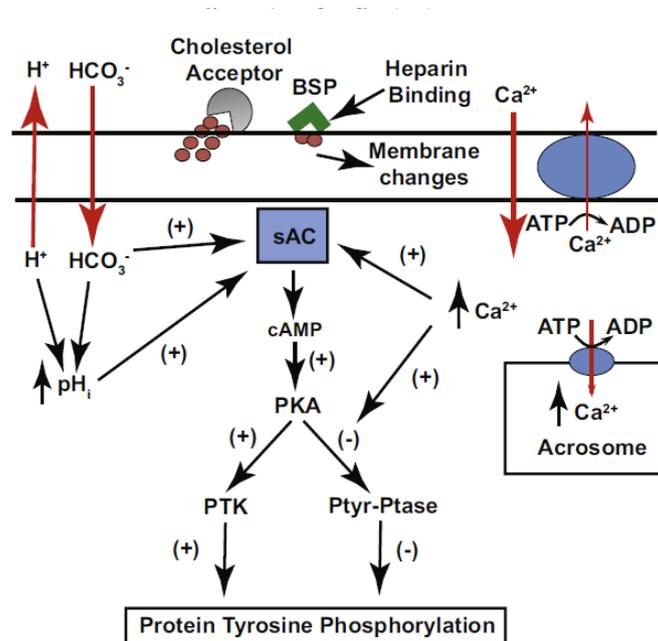


Figura 5. Modelo proposto de eventos intracelulares durante a capacitação de espermatozoides bovinos pela heparina (Fonte: PARRISH, 2014).

2.4 Protocolo proposto

Decorridos 30 anos desde o nascimento do primeiro potro nascido de um procedimento de fecundação *in vitro* de oócito equino maturado *in vivo* por espermatozoide tratado com cálcio ionóforo (A23187) (PALMER *et al.*, 1991), nenhum protocolo que reproduzisse o mesmo resultado de forma confiável foi estabelecido até o momento (CHOI *et al.*, 1994; DELL'AQUILA *et al.*, 1997a,b; ALM *et al.*, 2001;

HINRICHS *et al.*, 2002; TREMOLEDA *et al.*, 2003; MUGNIER *et al.*, 2009a). LEEMANS *et al.* (2016) realizaram uma compilação geral dos estudos publicados sobre a FIV em equinos até o momento da publicação (Tabela 1), o que ilustra as baixas taxas de sucesso, que variaram entre 0% e 33%. Teoricamente, os obstáculos à FIV equina podem residir no nível de uma maturação *in vitro* inadequada de oócitos ou uma capacitação incompleta de espermatozoides. Frente a isso, diversos agentes indutores foram utilizados na tentativa de promover a capacitação espermática no sêmen equino, como o ionóforo de cálcio (A23187) (LI *et al.*, 1995, ALM *et al.*, 2001), a heparina (LI *et al.*, 1995, ALM *et al.*, 2001), proteínas da zona pelúcida (GRAHAM, 1996), cafeína (GRAHAM, 1996), lisofosfolípidios (GRAHAM, 1996) e progesterona (TREMOLEDA *et al.*, 2003), mas não apresentaram resultados repetíveis de fecundação *in vitro*. Além disso, existem o efeito de *zona hardening*, que promove o endurecimento irreversível da zona pelúcida resultante da liberação prematura de grânulos corticais desencadeada por condições sub-ótimas de maturação *in vitro* ou falha na penetrabilidade da zona pelúcida tenha um papel importante na falha da fertilização *in vitro* equina (DELL'AQUILA *et al.*, 1999; TREMOLEDA *et al.*, 2003). Por outro lado, sistemas de ensaios reprodutivos como a remoção parcial e perfuração da zona pelúcida melhoraram as taxas de penetração de espermatozoides (CHOI *et al.*, 1994, LI *et al.*, 1995, DELL'AQUILA *et al.*, 1996), mas aumentaram as taxas de polispermia, tornando tais abordagens de menor praticidade.

Em 2009, McPartlin *et al.* relataram taxas de fecundação e clivagem muito promissoras (61%) após co-incubarem oócitos com espermatozoides equinos tratados com procaína (MCPARTLIN *et al.*, 2009). Resultados semelhantes suportaram esses achados posteriormente por Ambruosi *et al.* (2013). Entretanto, foi visto que a procaína tem o potencial de induzir a ativação artificialmente oócitos equinos (GOUDET *et al.*, 2016), ou seja, que a clivagem observada por McPartlin *et al.* (2009) e Ambruosi *et al.* (2013) foi resultado da procaína e não da fecundação do oócitos pelo espermatozoide. Assim, ainda hoje, não se têm o conhecimento adequado do mecanismo fisiológico de capacitação na espécie equina, não havendo até o momento um agente indutor da capacitação espermática específico para a espécie equina (LEEMANS *et al.*, 2019).

O protocolo descrito neste estudo têm como objetivo promover a indução da capacitação espermática e da reação acrossômica em espermatozoides equinos de forma

sequencial, utilizando a heparina e o cálcio ionóforo (A23187) como agentes indutores, para os respectivos processos. Utilizamos inicialmente a espécie bovina como modelo para estabelecer o protocolo, por ser uma espécie de manipulação tecnicamente já consolidada, para, posteriormente, traduzir a aplicação dos procedimentos a espécies cuja eficiência de fecundação é baixa e variável (bubalinos, caprinos, ovinos) ou mesmo ineficiente, como a espécie equina.

A indução da capacitação espermática foi realizada com o uso de 5, 10 e 15 UI/mL de heparina por 2 h, mas as concentrações podem ser modificadas conforme as necessidades de cada espécie ou indivíduo. Após a averiguação da melhor concentração, ou seja, a concentração que promover a melhor resposta, utilizaremos de duas concentrações (0,1 e 1 μ M) de cálcio ionóforo (A23187) por 1 min. O *status* da capacitação espermática e da reação acrossômica será avaliada utilizando a coloração de clortetraciclina (CTC), descrita por Pérez *et al.* (1996). A sobrevivência celular será avaliada pela técnica dupla de azul de tripano e Giemsa, descrita por Kovacs e Foote (1992). Assim, determinaremos de forma detalhada o *status* de capacitação espermática, reação acrossômica e a taxa de sobrevivência espermática, partindo do descongelamento, por meio da metodologia de *swim up* para a remoção do diluente e crioprotetores, até a segregação espermática, com o uso do Mini-Percoll, e após o período de incubação com cada concentração de heparina (5, 10 e 15 UI/mL), o qual optamos por um período de 2 h de incubação, visando observar o comportamento do sêmen, de forma dinâmica, durante todo o processo.

Uma vez estabelecido de forma eficiente, promovendo taxas satisfatórias de capacitação e de reação acrossômica, buscaremos conduzir ensaios de penetração/fecundação utilizando sistemas como os oócitos bovinos sem zona pelúcida, semelhante ao proposto por Yanagimachi (1972) em oócitos de hamster, com vistas a avaliar a eficiência de forma fisiológica do protocolo proposto, além de, para tornar-se uma alternativa sobre o efeito de *zona hardening* observado na espécie equina. Assim, de acordo com McPartlin *et al.* (2009) e Ambruosi *et al.* (2013), a ocorrência da fecundação será classificada pela presença de, pelo menos dois, pronúcleos ou clivagem após uma co-incubação dos gametas por 18 h. As taxas de penetração/fecundação também serão avaliadas pela presença de dois pronúcleos através da coloração de Hoechst 33342.

Tabela 1. Compilação de resultados publicados de fecundação *in vitro* na espécie equina

Maturação oocitária	Nº de oócitos	Tipo de sêmen	Indução da capacitação espermática	% oócitos fecundados com 2 PN	% oócitos clivados	Referência
<i>In vivo</i>	113	<i>In natura</i>	Cálcio Ionóforo (A23187)	14 ^a	-	Palmer <i>et al.</i> (1991)
<i>In vivo</i>	173	<i>In natura</i>	Cálcio Ionóforo (A23187)	17 ^a	13 ^a	Bézar <i>et al.</i> (1992)
<i>In vitro</i>	57	Congelado	Cafeína/Cálcio Ionóforo (A23187)	4	-	Choi <i>et al.</i> (1994)
<i>In vitro</i>	232	Congelado	Heparina	12–33*	0–1*	Dell'Aquila <i>et al.</i> (1996)
<i>In vitro</i>	206	Congelado	Heparina	4–17*	0	Dell'Aquila <i>et al.</i> (1997a)
<i>In vitro</i>	203	Congelado	Heparina	6–8*	2–3*	Dell'Aquila <i>et al.</i> (1997b)
<i>In vitro</i>	349	<i>In natura e congelado</i>	Heparina/Cálcio Ionóforo (A23187)	11–30*	-	Alm <i>et al.</i> (2001)
<i>In vitro</i>	815	<i>In natura</i>	Cálcio Ionóforo (A23187)	0–24*	-	Hinrichs <i>et al.</i> (2002)
<i>In vitro</i>	54	<i>In natura</i>	Cálcio Ionóforo (A23187)	33	24	Zhang <i>et al.</i> (1990)
<i>In vitro</i>	370	<i>In natura e congelado</i>	Progesterona	0	-	Tremoleda <i>et al.</i> (2003)
<i>In vitro</i>	385	Congelado	Heparina/Cálcio Ionóforo (A23187)/BSA	0–40 ^b *	-	Roasa <i>et al.</i> (2007)
<i>In vitro</i>	994	Congelado	Cálcio Ionóforo A23187	0–8*	-	Mugnier <i>et al.</i> (2009b)
<i>In vitro</i>	21	<i>In natura</i>	Cafeína	0	-	Mugnier <i>et al.</i> (2009a)
<i>In vitro</i>	74	<i>In natura</i>	Procaína	40–84 ^{c*}	-	McPartlin <i>et al.</i> (2009)
-	-	<i>In natura</i>	10% de fluido folicular	19 ^c	-	Lange-Consiglio e Cremonesi (2011)
<i>In vitro</i>	154	<i>In natura</i>	Procaína	38–62*	-	Ambrosi <i>et al.</i> (2013)

^aNascimento de um potro de fecundação *in vitro*; ^bAlta taxa de fecundação foi afetada por um ejaculado específico; ^cOócitos fecundados e clivados; *Dependendo das diferentes condições testadas; - sem informações apresentadas no trabalho. Fonte: Adaptada de LEEMANS *et al.* (2016).

Frente à ainda deficiente base de conhecimento acerca da fecundação em mamíferos, há uma limitação quanto à aplicação técnica em processos eficazes de produção *in vitro* de embriões pela FIV em espécies de interesse zootécnico. Neste contexto, há espécies com um emprego comercial sustentável da PIV pela FIV já há décadas, como os bovinos, enquanto outras ainda esbarram em etapas básicas da FIV *per se*, como os equinos. A tradução do conhecimento adquirido ao longo das décadas, de forma horizontal e comparativa entre espécies, tem auxiliado no avanço dos processos técnico-científicos e na geração de novos conhecimentos. Muitas vezes pode-se resgatar procedimentos obsoletos aos olhos da ciência, antes considerados úteis, e que na medida do tempo perderam espaço de aplicação pelo desenvolvimento de novos processos, mais modernos, mais rápidos, eficientes e economicamente viáveis, para serem aplicados em novas circunstâncias e cenários, podendo, com a evolução dos tempos, trazer resultados surpreendentes. Vários processos na PIV de embriões mamíferos já passaram por tal situação, e muito ainda deverá transcorrer em circunstância semelhante em futuro próximo. A baixa eficiência na PIV pela FIV em várias espécies mamíferas domésticas esbarra no inadequado conhecimento de detalhes em vários processos biológicos e fisiológicos. Isto demonstra que não necessariamente por conhecermos alguns aspectos nas espécies de maior eficiência, como em bovinos, poderemos obter resultados e respostas adequadas em outras espécies, como em equinos e em outros ruminantes domésticos. Em equinos, por exemplo, espécie à qual a FIV é ineficiente, processos altamente complexos estão em prática enquanto não se desvendam os mistérios da FIV, como o uso crescente da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

3.1 Hipóteses

- a) O sêmen bubalino, ovino, caprino e equino congelado responde à indução da capacitação espermática *in vitro* após exposição à heparina, com taxas de sobrevivência espermática semelhantes ao sêmen bovino congelado após incubação *in vitro* para utilização em procedimento de fecundação *in vitro* de oócitos com ou sem zona pelúcida.
- b) O sêmen equino congelado responde à indução da capacitação espermática *in vitro* e à reação acrossômica *in vitro* após exposição à heparina e ao cálcio ionóforo (A23187), respectivamente, com taxas de capacitação, reação acrossômica e de sobrevivência espermática semelhantes ao sêmen bovino congelado após incubação *in vitro*.

3.2 Objetivo geral

- a) Adequar um protocolo para a manipulação de sêmen congelado de mamíferos domésticos para uso na FIV, utilizando os procedimentos e a espécie bovina como modelo e controle, com vistas a uma eficiente indução da capacitação espermática e da reação acrossômica *in vitro* em espécies cuja eficiência de fecundação é baixa e variável (bubalinos, caprinos, ovinos) ou mesmo ineficiente, como a espécie equina.

3.3 Objetivos específicos

- a) Comparar as taxas de capacitação espermática *in vitro* e de sobrevivência à incubação *in vitro* de sêmen congelado bubalino, ovino, caprino e equino, frente ao bovino, após a exposição a distintas concentrações da heparina como agente capacitante.
- b) Avaliar as taxas de fecundação *in vitro* monospermica, polispermica e total de oócitos bovinos sem zona pelúcida utilizando espermatozoides bovinos de sêmen congelado, após a indução da capacitação e da reação acrossômica *in vitro*.
- c) Comparar as taxas de capacitação espermática, reação acrossômica e de sobrevivência *in vitro* de sêmen congelado equino após exposição a distintas concentrações da heparina e de cálcio ionóforo (A23187).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Realização do Estudo e Delineamento Experimental

4.1.1 Local de Realização do Estudo

As atividades experimentais foram realizadas junto ao Laboratório de Embriologia e Biotécnicas de Reprodução da Faculdade de Veterinária (FAVET) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Almejando alcançar os objetivos estipulados, o presente trabalho foi realizado em dois experimentos (I e II). O projeto do presente estudo foi aprovado pela comissão de pesquisa (COMPesq-FAVET/UFRGS).

4.1.2 Delineamento Experimental

O Experimento I consistiu em quatro etapas. Na primeira etapa, avaliou-se a resposta de sêmen bovino criopreservado de três touros, submetido ao tratamento padrão de indução de capacitação em uso no laboratório para o procedimento de PIV de embriões bovinos (5 UI/mL de heparina). Na segunda etapa, avaliou-se o *status* de capacitação espermática e sobrevivência *in vitro* do sêmen criopreservado de ruminantes domésticos (bovino, bubalino, caprino e ovino) e de equino após serem incubados com 5, 10 e 15 UI/mL de heparina. Na terceira etapa, sêmen bovino criopreservado, após indução de capacitação *in vitro* com 10 UI/mL de heparina, foi submetido à indução da reação acrossômica *in vitro* utilizando 0,1 e 1 μ M de cálcio ionóforo (A23187). Na quarta etapa, sêmen bovino criopreservado, com capacitação e reação acrossomal induzidas, foi utilizado na FIV com oócitos sem ZP para avaliar a eficiência do protocolo. Nesta última etapa, utilizaram-se oócitos com zona pelúcida para a FIV convencional e para a ativação partenogênica, como grupos controle.

O Experimento II consistiu de duas etapas. Na primeira etapa, sêmen equino criopreservado de cinco garanhões foi submetido à indução da capacitação espermática com o uso de heparina nas concentrações de 50 e 100 UI/mL, com a avaliação da taxa de capacitação espermática *in vitro* e da sobrevivência após incubação. Na segunda etapa, sêmen equino de dois garanhões com maior sobrevivência *in vitro* após a incubação foi

submetido à reação acrossômica pela exposição ao cálcio ionóforo (A23187) nas concentrações 0,1 e 1 μM , com avaliação das taxas de reação acrossômica e de sobrevivência *in vitro* após a incubação.

4.2 Meios e Reagentes

Quando não mencionados, foram utilizados reagentes e produtos da Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, EUA), testados para embriões ou cultivos celulares. Todos os meios foram preparados com água purificada pelo sistema Direct-Q3/Milli-Q Synthesis (Millipore, Bedford, EUA).

4.3 Sêmen criopreservado

Os experimentos utilizaram doses de sêmen bovino, ovino, bubalino e equino, congelado em palhetas médias (0,5 mL), e doses de sêmen caprino congelado em palhetas finas (0,25 mL). Foi utilizado sêmen bovino congelado de três touros: touro A (Red Angus; sêmen diluído em meio tris-gema-glicerol e congelado em nível de campo), touro B (Angus; sêmen comercial diluído com meio-base com leite), e touro C (Holandês; sêmen comercial). O sêmen congelado ovino (Texel; sêmen diluído em tris-gema-glicerol e congelado em nível de campo), bubalino (Mediterrâneo; sêmen diluído em tris-gema-glicerol e congelado em nível de campo), e caprino (sêmen comercial) eram de apenas um reprodutor. Foi utilizado sêmen equino congelado de cinco garanhões da raça Crioula (sêmen diluído em diluidor comercial Botu-Crio[®] e congelado em central comercial). Foram realizadas três repetições para cada reprodutor, de todas as espécies. Para cada repetição foram utilizadas duas palhetas por espécime animal.

As doses de sêmen foram descongeladas em banho-maria a 37°C por 30 s. Imediatamente após o descongelamento, as doses de sêmen foram submetidas às avaliações dos parâmetros espermáticos, compreendendo a concentração espermática, o percentual de motilidade espermática total (M), o vigor de motilidade espermático (V; 0 a 5) e o exame de morfologia espermática. De cada amostra, uma gota de 10 μL era depositada entre lâmina e lamínula para a avaliação dos parâmetros espermáticos (motilidade e vigor) sob microscopia de contraste de fase (100 a 400 \times). A concentração de cada amostra foi realizada através da contagem do número de células com o uso da

câmara de Neubauer. Uma alíquota de 5 µL de cada amostra era depositada em um microtubo contendo 95 µL de formol salino; após a diluição, uma gota de 10 µL era depositada entre lâmina e lamínula para a avaliação da morfologia espermática sob microscopia de contraste de fase (1000×). As amostras de sêmen congelado apresentavam parâmetros dentro dos padrões mínimos determinados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013), para as espécies utilizadas (bovinos, bubalinos, caprinos, equinos e ovinos), com motilidade espermática total (M) acima de 30%; vigor de motilidade ≥ 3 (1 a 5); concentração de espermatozoides móveis de $\geq 10 \times 10^6/\text{mL}$ para sêmen bovino e bubalino, $100 \times 10^6/\text{mL}$ para sêmen ovino e equino, $40 \times 10^6/\text{mL}$ para sêmen caprino. O percentual de espermatozoides com morfologia normal foi $\geq 60\%$; $\geq 70\%$; e $\geq 80\%$ para sêmen equino, bovino e bubalino, respectivamente, e para sêmen caprino e ovino foi $\leq 10\%$ de defeitos maiores.

4.4 Processamento e segregação espermática

Os espermatozoides foram segregados por duas técnicas distintas, o método de migração ascendente (*swim up*), descrito por Parrish *et al.* (1999), e o método de gradiente de Mini-Percoll[®], baseado em Machado *et al.* (2009), ambos com pequenas modificações. Como presume-se uma maior taxa de capacitação espermática após a segregação por mini-Percoll, causada pelas forças físicas da centrifugação no gradiente de sílica, a segregação por *swim up* teve o objetivo de servir como controle negativo em cada amostra, evidenciando o *status* do sêmen após a criopreservação.

Decorrido o descongelamento e as análises microscópicas das doses de sêmen de cada espécie, em cada experimento, cada amostra foi dividida em alíquotas para a segregação espermática por *swim up* e por mini-Percoll.

4.4.1 *Swim up*

Um volume de 500 μL de sêmen congelado de cada reprodutor era fracionado em partes de 100 μL , na qual cada parte (100 μL) da fração era depositada cuidadosamente no fundo de microtubos de 1,5 mL de fundo redondo contendo 900 μL de Sperm-TALP, previamente aquecido, e mantido em incubadora a 39°C e 5% de CO_2 por 60 min. Após a incubação, o sobrenadante foi removido (cerca de 600 μL) e centrifugado a 120 g por 5 min. Após, retirava-se 300 μL do sobrenadante, restando 300 μL de suspensão espermática em cada tubo, os quais eram homogenizados e, por fim, juntava-se à suspensão dos tubos em dois tubos com 750 μL , os quais eram centrifugados novamente a 120 g por 1 min. Logo, retirava-se 700 μL de sobrenadante de cada tubo, restando 50 μL de suspensão espermática em cada tubo que, por fim, juntava-se em um microtubo finalizando com 100 μL de suspensão espermática para análises de motilidade e vigor de motilidade, viabilidade celular e determinação do *status* de capacitação espermática pré-indução após coloração, conforme abaixo.

4.4.2 *Gradiente de Mini-Percoll (MP)*

Uma alíquota de 250 μL de cada dose de sêmen foi depositada sobre o gradiente de Mini-Percoll® formado por 300 μL de solução de Percoll de 45% e de 90% em microtubos de 1,5 mL, previamente aquecidos e estabilizados em incubadora a 39°C e 5% de CO_2 , e submetidos à centrifugação de 650 g por 10 min. Após, removeu-se o sobrenadante e o precipitado foi diluído em 500 μL de meio Sperm-TALP sem BSA e centrifugado a 160 g por 5 min para remoção do Percoll. Após, retirou-se o sobrenadante, restando 100 μL de suspensão espermática no tubo para análises de motilidade e vigor de motilidade, e viabilidade celular e determinação do *status* de capacitação espermática pré-indução após coloração.

Uma amostragem de cada método de segregação, para cada dose após o processamento, foi submetida a avaliações dos parâmetros espermáticos de concentração espermática, percentual de motilidade espermática total (M) e vigor de motilidade espermático (V).

4.5 Experimento I – Determinação do padrão de capacitação e reação acrossômica em sêmen criopreservado de ruminantes domésticos (bovino, bubalino, caprino e ovino) e equinos, e ensaio preliminar de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos sem zona pelúcida

4.5.1 Indução in vitro da capacitação espermática

Neste experimento, foram utilizadas doses de sêmen criopreservado de três touros bovinos, um touro bubalino, um carneiro, um bode e um garanhão. O descongelamento e o processamento das amostras de sêmen de cada espécime animal foram realizados conforme descrito acima. Alíquotas de 10 µL do sêmen segregado de cada amostra foram retiradas para avaliação por colorações da viabilidade celular e da capacitação espermática *espontânea*, observada após o *swim up*, e fisicamente induzida, observada após o procedimento do Mini-Percoll, ambos servindo de controle antes da indução da capacitação espermática seguida de incubação. Para a indução *in vitro* da capacitação espermática, alíquotas de 50 µL de cada amostra segregada, ou seja, após o Mini-Percoll, foram diluídas em 50 µL de meio Fert-TALP contendo 5, 10 e 15 UI/mL de heparina, sendo incubadas por 2 h em incubadora a 39°C e 5% de CO₂ e umidade saturada. As avaliações de viabilidade e capacitação espermática em cada tratamento foram realizadas (i) imediatamente após a adição do meio Fert-TALP contendo heparina (T0); e (ii) após 2 h de incubação (T2), por coloração, conforme abaixo.

Este experimento foi constituído de quatro etapas. Na etapa 1, amostras de sêmen bovino descongelado dos três touros foram submetidas à indução de capacitação *in vitro*, utilizando a dose padrão de heparina (5 UI/mL de heparina) do laboratório utilizada para procedimento de PIV, após a segregação pela técnica de Mini-Percoll. Na etapa 2, utilizaram-se três tratamentos de heparina (5, 10 e 15 UI/mL de heparina) para a indução de capacitação *in vitro* de sêmen bovino e das demais espécies, para a avaliação da resposta destas espécies ao agente capacitante heparina, sob as condições e protocolo utilizado em nosso laboratório para a espécie bovina após o processamento com o Mini-Percoll.

4.5.2 Indução *in vitro* da reação acrossômica em sêmen bovino

Para a indução *in vitro* da reação acrossômica, espermatozoides bovinos foram segregados e capacitados *in vitro* com o tratamento de 10 UI/mL de heparina, concentração na qual os três touros apresentaram taxas de capacitação semelhantes. Após 2 h de incubação, como controle uma alíquota de 10 µL dessa suspensão foi submetida à avaliação da capacitação e reação acrossômica; logo após, o restante da suspensão dos espermatozoides foi exposto ao cálcio ionóforo (A23187) em Sperm-TALP nas concentrações de 0,1 e 1 µM por 1 min a 39°C e 5% de CO₂, protegidos da luz (Anexo 1). Decorrido esse período de incubação, as suspensões de espermatozoides eram diluídas (fator de diluição de 1:10 e 1:50 para as respectivas concentrações) e centrifugadas a 120 g por 5 min, para a lavagem e remoção por diluição do cálcio ionóforo (A23187). Imediatamente, após a centrifugação, os espermatozoides foram submetidos à coloração com clortetraciclina (CTC) para determinação da capacitação e da reação acrossômica, conforme abaixo.

As amostras de todos os touros foram avaliadas quanto às taxas de capacitação e reação acrossômica induzidas *in vitro* e quanto às taxas de viabilidade (i) após 1 h de incubação por segregação pelo método *swim up* e pelo gradiente descontínuo de Mini-Percoll; (ii) imediatamente após a diluição em meio Fert-TALP contendo heparina nas respectivas concentrações de cada tratamento (T0); e (iii) após 2 h de incubação subsequente (T2), conforme abaixo.

4.5.3 Determinação das taxas de capacitação e reação acrossômica induzidas *in vitro*

A avaliação do padrão de capacitação *in vitro* dos espermatozoides de todos os espécimes animais em estudo foi realizada por meio da técnica de coloração com clortetraciclina (CTC), descrita por Pérez *et al.* (1996), com modificações (Anexo 2). Para determinar o *status* de capacitação dos espermatozoides, foram retiradas alíquotas de 10 µL da suspensão de cada unidade experimental, sendo diluídas em 20 µL de solução de 4 mg/mL de CTC, à temperatura ambiente. Após 1 min da diluição, as amostras foram fixadas em paraformaldeído a 12% por 8 s, com 10 µL de cada amostra sendo disposta entre lâmina e lamínula a 37°C. A interpretação da coloração dos espermatozoides foi realizada de acordo com a classificação descrita pelo Atlas Embrapa (MARTINS, 2016),

com o padrão de capacitação espermática avaliado em três níveis: 1) espermatozoides não capacitados (NCA), os quais apresentaram fluorescência brilhante em toda a cabeça; 2) espermatozoides capacitados (CA), apresentando ausência ou baixa fluorescência na região pós-acrossomal e fluorescência brilhante na região acrossomal; e 3) espermatozoides com acrossomas reagidos (RA), os quais apresentarem ausência ou baixa fluorescência na cabeça, com um anel fluorescente na região equatorial espermática (Figura 6). As análises das colorações foram realizadas em microscopia de epifluorescência, com filtro (filtro RKP 455) para emissão e excitação de 355 e 425 nm, respectivamente, em aumento de 1000× de magnitude, sob imersão em óleo, e contagem de 200 espermatozoides.

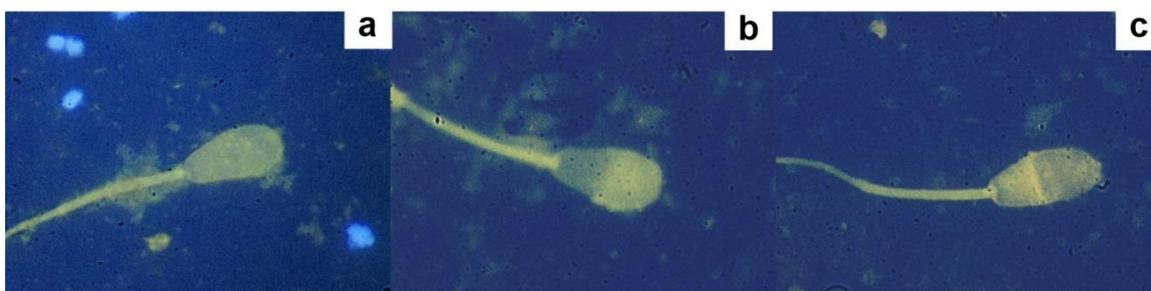


Figura 6. Padrões de coloração com clortetraciclina CTC de espermatozoides bovinos criopreservado, sob microscopia de epifluorescência em magnitude de 1000×. (a) Padrão NCA (células não capacitadas); (b) padrão CA (células capacitadas); (c) padrão RA (células capacitadas com acrossoma reagido). (Fonte: do autor).

4.5.4 Determinação da viabilidade espermática *in vitro*

Para avaliar a viabilidade dos espermatozoides ao longo do processamento e incubação *in vitro*, foi realizada a coloração de azul de tripano e Giemsa, descrita por Kovacs & Foote (1992), com modificações (Anexo 3). Alíquotas de 10 μ L de cada amostra de sêmen de todos os espécimes animais em estudo foram diluídas em 10 μ L da solução de azul de tripano a 0,4% em microtubo de 1,5 mL, previamente aquecido, e incubado por 15 min a 37°C. Em seguida, foram feitos dois esfregaços utilizando 10 μ L da suspensão, sendo secos ao ar. Logo, os esfregaços foram fixados em álcool absoluto por 5 min, sendo secos ao ar. Os esfregaços foram então corados com uma solução de

Giemsa 0,04 g/mL por 1 h em incubadora a 38°C. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas para secar à temperatura ambiente. A avaliação das lâminas foi realizada em microscópio de campo claro com a contagem de 200 células, sob imersão, em magnitude de 1000×. A interpretação da coloração dos espermatozoides foi realizada de acordo com a classificação descrita pelo Atlas Embrapa (MARTINS, 2016): 1) mortos com acrossoma íntegro, os quais apresentavam a cabeça corada de azul, com acrossoma corado de rosa-escuro; 2) mortos com reação acrossomal, com espermatozoides com a cabeça corada de azul e com acrossoma não visível (descorado); 3) vivos com acrossoma íntegro, com espermatozoides com a cabeça corada de rosa claro e com o acrossoma corado de rosa-escuro; e 4) vivos com reação acrossomal, com espermatozoides com a cabeça corada de rosa-claro e com acrossoma não visível (Figura 7).

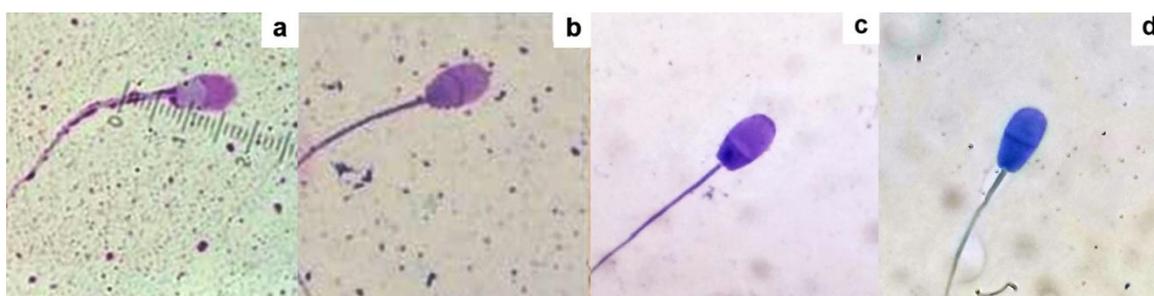


Figura 7. Padrões de coloração de Giemsa e azul de tripano em espermatozoides bovinos em microscópio de luz em magnitude de 1000×. a) Padrão AI (acrossomo íntegro); b) padrão ANI (acrossomo não íntegro); c) padrão MAI (morto com acrossomo íntegro); d) Padrão MRA (morto com acrossomo reagido). (Fonte: do autor).

4.5.5 Procedência e destino dos ovários bovinos

Os ovários bovinos foram provenientes de um abatedouro localizado no município de São Leopoldo, RS. Após a coleta, o transporte dos ovários até o laboratório foi realizado em um recipiente térmico contendo PBS aquecido a 30°C. Após a aspiração folicular, os ovários foram armazenados em sacolas específicas para resíduos biológicos e encaminhados para o descarte de material biológico da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

4.5.6 *Aspiração folicular e seleção de complexos cumulus-oócito (CCO) bovinos*

Após o recebimento dos ovários, realizou-se a lavagem com solução fisiológica aquecida a 37°C sem antibiótico. Folículos com diâmetro entre 3 e 8 mm foram aspirados com seringa descartável de 5 mL acoplada a agulha 18 G, com o conteúdo sendo armazenado em tubos de centrifuga de 15 mL. Posteriormente, o conteúdo folicular foi filtrado e transferido para placas de Petri de 90 mm, onde foi diluído com PBS acrescido de 0,1% de Soro Fetal Bovino (SFB; Invitrogen, Carlsbad, EUA). Os CCOs foram recuperados sob estereomicroscópio e transferidos para uma placa de Petri de 35 mm contendo TCM199 acrescido de 0,1% de SFB. Os CCOs foram avaliados e selecionados morfológicamente conforme descrito por Hasler *et al.* (1995) em grau 1, CCOs rodeados por quatro ou mais camadas de células do *cumulus* compactas; grau 2, CCOs com uma a três camadas de células do *cumulus* compactas; grau 3, oócitos desnudos; grau 4, CCOs com *cumulus* com algum grau de expansão. Foram considerados CCOs viáveis aqueles de forma esférica, com três ou mais camadas compactas de células do *cumulus* e citoplasma homogêneo.

4.5.7 *Maturação in vitro (MIV)*

Os CCOs previamente selecionados (com morfologia de grau 1 e 2) foram submetidos à MIV em gotas de 100 µL (15 CCOs/gota) de meio de MIV, composto de TCM-199 (M5017), suplementado com 2,4 mM de NaHCO₃, 2,2 mg/mL de piruvato de sódio (P4562), 50 µM de cisteamina (M9768), 1% de solução antibiótica-antimicótica (Estreptomicina, Anfotericina B, Penicilina; G15240-062 100X - Gibco® Antibiotic-Antimycotic), 5 µg/mL de FSH suíno (Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Belleville, ON, Canadá), 5 µg/mL de LH (Lutropin; Bioniche Animal Health), 1 µg/mL de estradiol, 100 ng/µL de fator epidermal de crescimento (eGF; E4127) e 10% de SFB (Fetal Bovine Serum; Thermo Fisher Scientific, Brasil), sob óleo mineral estéril, por um período de 18 h em incubadora a 38,5 °C, umidade saturada e 5% de CO₂.

4.5.8 *Remoção da zona pelúcida de oócitos maturados e visualização dos corpúsculos polares*

Após 18 h de MIV, um grupo de CCOs foi retirado das gotas de meio, com aproximadamente a metade aleatoriamente retornando às gotas de meio, permanecendo em MIV até 24 h de maturação para a realização da FIV convencional. O grupo de CCOs removido da MIV com 18 h de maturação foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo hialuronidase a 0,1% em TCM199 +10% SFB para incubação por 5 min a 39°C. Em seguida, o tubo foi levado para agitação por vórtex por 4 min, com os oócitos sendo lavados em TCM199 + 10% SFB e selecionados pela visualização do primeiro corpúsculo polar, indicativo de maturação nuclear. Após, os oócitos maturados foram segregados de forma aleatória em dois grupos, sendo o primeiro submetido à ativação partenogénica, e o segundo exposto à solução de protease a 0,5% (P8811) em TCM199 + 0,01% PVA para a digestão da zona pelúcida (ZP, por controle visual). Em seguida, os oócitos sem zona foram lavados em TCM199 + 10% SFB. Os oócitos com ZP que foram destinados para a ativação partenogénica foram realocados à placa de MIV, até completar 24 h de maturação, quando foi realizada a ativação química. Os oócitos sem ZP foram alocados individualmente em gotas de 10 µL de meio de MIV sob óleo mineral, até completar 24 h de maturação, sendo este o momento da FIV.

4.5.9 *Ativação partenogénica química dos oócitos maturados*

Os CCOS selecionados para a ativação partenogénica, após 24 h de MIV, foram expostos a uma solução de 5 µM de ionomicina em TCM199 + 10% SFB por 5 min e, imediatamente após, foram lavados em TCM199 + 10% SFB, transferidos para gotas de meio Fert-TALP, e mantidos por 18 h em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ em ar a 38,5°C.

4.5.10 *Fecundação in vitro (FIV)*

Os CCOs que permaneceram em MIV por 24 h até a FIV convencional foram primeiramente lavados em gotas de meio Fert-TALP, sendo então transferidos para gotas de 50 µL (15 CCOs/gota) de Fert-TALP (PARRISH; SUSKO-PARRISH; FIRST, 1988), sob óleo mineral estéril. Os oócitos sem ZP foram lavados e transferidos para gotas de 10

μL (1 CCO/gota) de Fert-TALP, sob óleo mineral estéril. Para a fecundação, foi utilizado sêmen congelado da mesma partida de um touro previamente testado para a PIV de embriões bovinos. As amostras do sêmen foram descongeladas e processadas conforme descrito anteriormente. Os espermatozoides foram submetidos à indução da capacitação pela exposição à 10 UI/mL de heparina, após a segregação espermática com auxílio da técnica de Mini-Percoll, conforme descrito no Experimento I. Espermatozoides a serem utilizados para na FIV foram induzidos à reação acrossômica com 1 μM de cálcio ionóforo (A23187), conforme descrito acima. Após, foi realizado o cálculo da concentração espermática, e cada gota contendo oócitos foi inseminada com uma dose de 5000 espermatozoides capacitados/oócito para a FIV convencional e 100 espermatozoides induzidos à reação acrossômica para a FIV de oócitos sem ZP. Os gametas permaneceram em co-incubação por 18 h nas mesmas condições atmosféricas da MIV.

4.5.11 Avaliação da configuração de cromatina após a FIV e ativação partenogênica

Grupos de zigotos putativos após 18 h da ativação partenogênica (estruturas com zona) ou do início da FIV (estruturas com ou sem ZP) foram fixadas em álcool absoluto a 4°C e corados com 15 $\mu\text{g/mL}$ de bisbenzimidazol (Hoechst 33342, B-2261) em álcool absoluto à temperatura ambiente. Após 10 min, as estruturas foram dispostas em uma gota de 5 μL de glicerol em uma lâmina, cobertos com uma lamínula, e avaliados quanto à configuração de cromatina em microscópio de epifluorescência, sob luz UV e filtro (RKP 455) com emissão e excitação de 355 e 425 nm, respectivamente, em objetiva de 1000x de magnitude. As estruturas foram avaliadas quanto: (a) à presença de um, dois ou três corpúsculos polares; (b) à presença ou não de placa metafásica; (c) à presença ou não de um, dois ou mais pronúcleos; (d) à presença e o número de espermatozoides não descondensados no ooplasma; e (e) ao número de espermatozoides aderidos à zona pelúcida (estruturas intactas de FIV) ou ao oolema (estruturas intactas ou sem ZP de FIV). Levou-se em consideração a possível combinação das características em avaliação, para cada tipo de zigoto putativo (partenoto, e de FIV com ou sem ZP).

4.5.12 Cultivo *in vitro* (CIV)

Após as 18 h de FIV, as estruturas remanescentes com ZP (de FIV ou partenotos) foram lavadas e cultivadas *in vitro* em gotas de 100 µL (15 CCOs/gota) de meio SOF modificado (HOLM *et al.*, 1999) até o Dia 2, suplementado com 0,72 mM de piruvato de sódio (Sodium pyruvate; P4562), 0,2 mM de glutamina (L -Glutamine; G8540), aminoácidos essenciais e não essenciais e 1% de SFB, sob óleo mineral, em incubadora a 38,5°C, 5% de O₂, 5% de CO₂, 90% de N₂ e umidade saturada. As estruturas sem ZP remanescentes foram cultivadas no sistema *well-of-the-well* (WOW), de acordo com Vajta *et al.* (2000) e modificado por Feltrin *et al.* (2006) até o Dia 2 de CIV, sob as mesmas condições acima. O dia da FIV foi considerado Dia 0 (D0) para a determinação dos estádios de desenvolvimento embrionário. No Dia 2, as estruturas (produtos da FIV com e sem ZP) foram submetidas à avaliação da clivagem e fixadas para a avaliação do *status* de cromatina.

4.6 Experimento II - Determinação do padrão de capacitação e reação acrossômica em sêmen equino criopreservado

Devido a não resposta frente à indução *in vitro* da capacitação espermática e à baixa viabilidade pós-incubação do sêmen congelado do garanhão utilizado no Experimento I, foram realizadas modificações no protocolo deste experimento, com o uso de maiores concentrações de heparina (50 e 100 UI/mL) e um período de tempo intermediário de avaliação durante a incubação (30 min). Três repetições foram realizadas, utilizando o sêmen congelado da mesma partida de cinco garanhões, incluindo o sêmen do garanhão utilizado no Experimento I. Neste experimento foi empregado o mesmo protocolo de segregação espermática por *swim up* e mini-Percoll do Experimento I, modificando-se a indução da capacitação espermática com a utilização de três concentrações de heparina (50 e 100 UI/mL). As amostras de sêmen dos garanhões foram avaliadas quanto às taxas de capacitação e reação acrossômica induzidas *in vitro* e quanto às taxas de viabilidade (i) após segregação pelo método *swim up* e pelo gradiente descontínuo de Mini-Percoll; (ii) imediatamente após a diluição em meio Fert-TALP contendo heparina (T0); e após (iii) 30 min (T30) e (iv) 2 h de incubação subsequente (T2). Para cada um desses grupos, foram confeccionadas duplicatas em cada lâmina por

rotina. Os ganhões responsivos aos tratamentos com heparina e com sêmen de maior viabilidade foram submetidos à indução *in vitro* da reação acrossômica nas concentrações de 0,1 e 1 μM de cálcio ionóforo (A23187), conforme já descrito acima.

4.7 Análise Estatística

As taxas de viabilidade espermática, de capacitação e reação acrossômica *in vitro* nos Experimentos I e II, e as taxas de fecundação e clivagem e proporções das configurações de cromatina no Experimento I foram comparadas entre grupos pelo teste do χ^2 ou Teste Exato de Fisher. Nos Experimentos I e II, considerou-se para a análise os valores observados dentro de cada espécime animal para as distintas concentrações de heparina e tempos de incubação (5, 10 e 15 UI/mL nos tempos 0 e 2 h no Experimento I; 0, 50 e 100 UI/mL nos tempos 0, 30 min e 2 h no Experimento II), e para as concentrações de cálcio ionóforo (0,1 e 1 μM). A análise de correlação simples entre as variáveis foi realizada após transformação por arco-seno ($\arcsin\sqrt{P/100}$) dos valores percentuais das médias de cada variável, considerando o coeficiente de correlação de Pearson (ρ) entre -1 e 1, utilizando o programa Minitab® para Windows (versão 19.2). O nível de significância foi de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 Experimento I

Na primeira etapa deste experimento, a espécie bovina apresentou uma taxa de mortalidade espermática de 6 a 12% e de capacitação espermática *in vitro espontânea* de 45% a 56% após o descongelamento pela segregação espermática realizada pela metodologia de *swim up* (Tabela 2). Após a segregação espermática pelo método de Mini-Percoll as taxas de mortalidade diminuíram (2 a 6%) e as de capacitação tiveram um discreto aumento (53 a 62%), embora não observamos diferença significativa entre os touros ($p < 0,05$). Mesmo após o período de incubação de 2 h, uma grande percentagem de células se mantiveram vivas (Tabela 3).

Tabela 2. Média (%) de espermatozoides bovinos mortos, não capacitados, capacitados e reagidos após a criopreservação pelo processo de segregação e a avaliação com a coloração com azul de tripano e com CTC

Características Espermáticas	Touros	Segregação
		<i>Swim up</i> (%)
Mortos	A	8 ^a
	B	12 ^a
	C	6 ^a
Não capacitados	A	44 ^a
	B	23 ^b
	C	34 ^{ab}
Capacitados	A	45 ^a
	B	56 ^a
	C	50 ^a
Acrossomos reagidos	A	1 ^b
	B	6 ^{ab}
	C	10 ^a

^{a-f}: Números seguidos de superescritos diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

A,B,C: Números seguidos de superescritos diferentes em cada linha diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Os resultados da indução da capacitação e da mortalidade espermática revelaram haver diferença ($p < 0,05$) no comportamento dos touros frente ao tratamento com a concentração de 5 UI/mL de heparina. Observou-se que os espermatozoides do touro C capacitaram em maior proporção e apresentaram baixa mortalidade em relação aos espermatozoides dos touros A e B (Tabela 4). No entanto (Etapa 2), e conforme apresentado na Figura 8, os espermatozoides do touro A capacitaram em maior proporção ($p < 0,05$) após a exposição às concentrações de 10 e 15 UI/mL de heparina, enquanto que o touro B não revelou diferenças na resposta às concentrações de heparina. Por outro lado, o touro C foi responsivo às três concentrações de heparina.

Na etapa 2 deste experimento, os espermatozoides bubalino, ovino e equino não apresentaram nenhuma resposta à indução da capacitação espermática à heparina, independente da concentração (5, 10 ou 15 UI/mL). Entretanto, os espermatozoides caprinos responderam em nível médio às três concentrações de heparina usadas para a indução da capacitação.

Os espermatozoides de bubalino, ovino e equino criopreservados apresentaram altas taxas de mortalidade após o descongelamento, averiguada pelo método de *swim up* (68%, 57%, 55%, respectivamente), que se manteve após o método de segregação espermática realizado pelo Mini-Percoll (21%, 33% e 18%) e após o período de incubação de 2 h (Figura 9) em comparação com os espermatozoides bovinos (Tabela 2 e 3). Já o sêmen caprino apresentou uma menor mortalidade após o período de incubação (33,4%) em relação as outras espécies, com exceção da espécie bovina. Em relação aos resultados obtidos, observamos uma forte correlação negativa ($p < 0,05$) entre as taxas de mortalidade e a proporção de espermatozoides não capacitados ($r = -0,792$), capacitados ($r = -0,761$) e reagidos ($r = -0,725$), em especial nas espécies bubalina, equina e ovina, denotando um possível efeito da viabilidade sobre os resultados observados nos tratamentos.

Tabela 3. Média (%) de espermatozoides de três touros bovinos apresentando acrossoma íntegro, acrossoma não íntegro, acrossoma reagido e proporção de mortos após 0 e 2 h de incubação em 5 UI/mL de heparina, após a avaliação por coloração com azul de tripano e Giemsa

Características espermáticas	Touro	Segregação	Coloração	
		Percoll	Azul de tripano e Giemsa	
		Controle (%)	Tempo de incubação	
			0 h (t0) (%)	2 h (t2) (%)
Acrossomo íntegro	A	81 ^{aA}	61 ^{bB}	45 ^{bC}
	B	80 ^{aA}	62 ^{bB}	62 ^{aB}
	C	81 ^{aA}	75 ^{aA}	50 ^{abB}
Acrossomo não íntegro	A	11 ^{aBC}	23 ^{aA}	18 ^{aAB}
	B	7 ^{aB}	22 ^{aA}	23 ^{aA}
	C	11 ^{aB}	6 ^{bB}	27 ^{aA}
Acrossomo reagido	A	7 ^{acB}	10 ^{aB}	24 ^{aA}
	B	7 ^{aA}	10 ^{aA}	8 ^{bA}
	C	5 ^{aA}	12 ^{aA}	7 ^{bA}
Mortos	A	2 ^{aB}	7 ^{aB}	14 ^{abA}
	B	6 ^{aA}	6 ^{aA}	7 ^{bA}
	C	3 ^{aB}	7 ^{aB}	16 ^{aA}

^{a-f}: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

^{A-C}: Letras diferentes em cada linha diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Tabela 4. Média (%) de espermatozoides bovinos não capacitados, capacitados e reagidos após o processo de segregação e o período da incubação com heparina 5 UI/mL após a avaliação com a coloração com CTC

Características Espermáticas	Touros	Segregação	Agente capacitante	
		Percoll (%)	Heparina (5 UI/mL)	
		Controle	Tempo de incubação	
			0 h (t0) (%)	2 h (t2) (%)
Não capacitados	A	30 ^{aB}	23 ^{aB}	28 ^{abB}
	B	30 ^{aA}	26 ^{aA}	38 ^{aA}
	C	37 ^{aA}	16 ^{aB}	17 ^{bB}
Capcitados	A	60 ^{aAB}	69 ^{aA}	67 ^{abA}
	B	62 ^{aA}	68 ^{aA}	60 ^{bA}
	C	53 ^{aB}	75 ^{aA}	77 ^{aA}
Acrossomos reagidos	A	10 ^{aA}	8 ^{aA}	5 ^{aBC}
	B	8 ^{aA}	6 ^{aA}	3 ^{aA}
	C	10 ^{aA}	9 ^{aA}	6 ^{aA}

^{a-e}: Números seguidos de superescritos diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

A,B,C: Números seguidos de superescritos diferentes em cada linha diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

As taxas de indução reação acrossômica *in vitro* apresentadas pelos 3 touros, Etapa 3, estão apresentadas na Tabela 4, na qual observa-se mais de 50% das células capacitadas encontram-se reagidas. No entanto, não houve diferenças significativas entre as taxas de acrossomas reagidos entre as duas concentrações de cálcio ionóforo (A23187) (0,1 e 1 μM) usadas neste ensaio em cada touro. Mas, entre os touros, o único que apresentou diferença entre as taxas foi o touro C, que obteve uma taxa menor de reação acrossômica em relação aos outros touros (A e B) na concentração de 0,1 μM . Entretanto, o percentil de espermatozoides reagidos não diferiu entre os três touros para a concentração de 1 μM de cálcio ionóforo (A23187), variando de 47 a 59%. (Tabela 5).

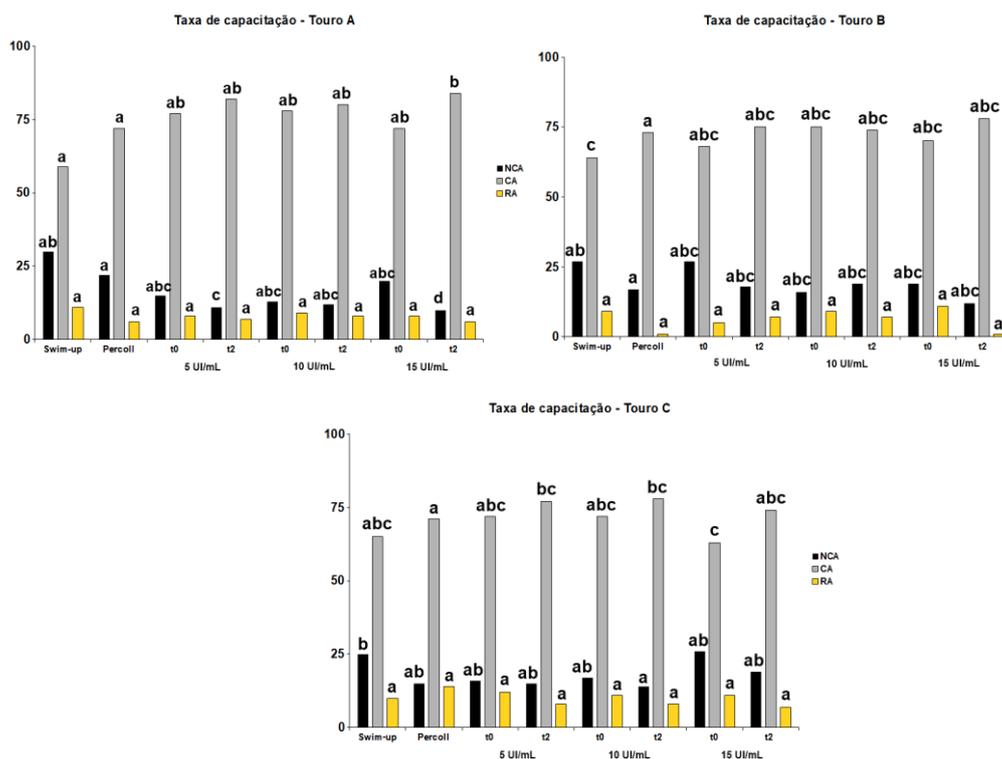


Figura 8. Taxas de capacitação espermática em três touros (Touros A, B, C) após incubação por 0 h (T0) e 2 h (T2) em 5, 10 ou 15 UI/mL de heparina. ^{a-d}: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$). No eixo X são apresentadas as representações das porcentagens de espermatozoides: vivos não-capacitados (representados por barras em preto e siglas “NCA”), vivos capacitados (representados por barras em cinza-claro e siglas “CA”) e vivos reagidos (representados por barras em amarelo e siglas “RA”). No eixo Y, são apresentadas as legendas dos métodos de

segregação espermática, os tempos de incubação e as distintas concentrações de heparina.

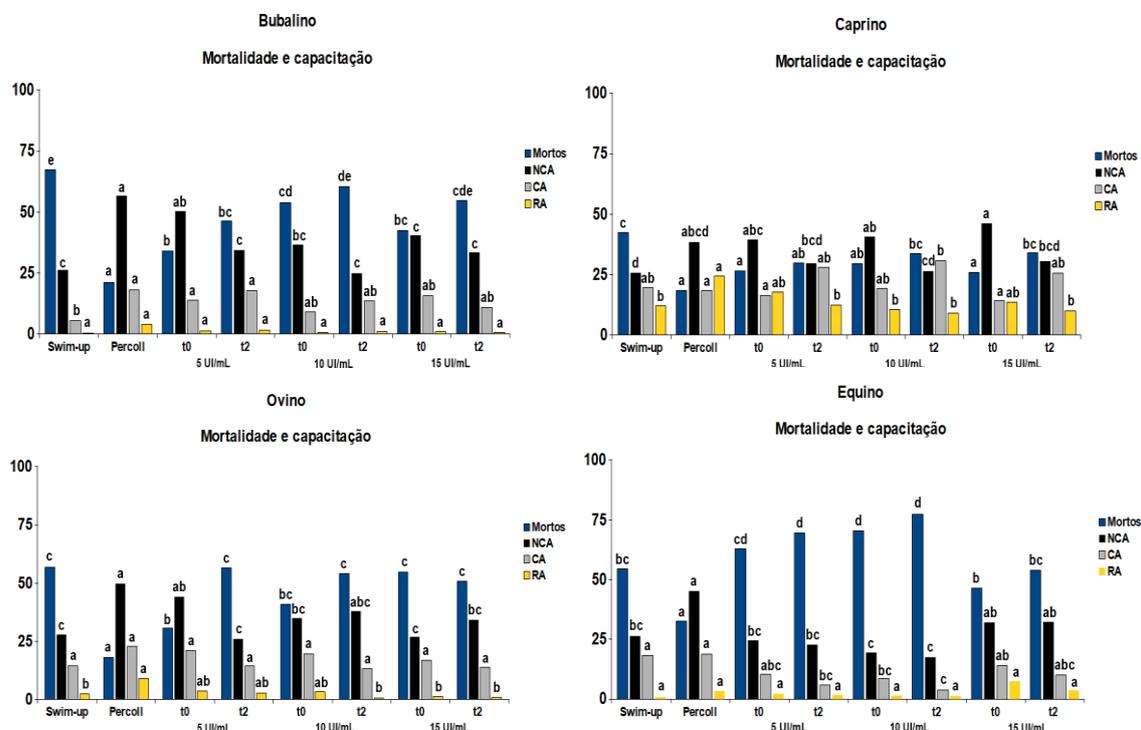


Figura 9. Taxas de sobrevivência e capacitação espermática de sêmen bubalino, caprino, equino e ovino, incubados por 0 e 2 h em 5, 10 ou 15 UI/mL de heparina. ^{a-d}: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$). No eixo X são apresentadas as representações das porcentagens de espermatozoides: vivos não-capacitados (representados por barras em preto e siglas “NCA”), vivos capacitados (representados por barras em cinza-claro e siglas “CA”) e vivos reagidos (representados por barras em amarelo e siglas “RA”). No eixo Y, são apresentadas as legendas dos métodos de segregação espermática, os tempos de incubação e as distintas concentrações de heparina.

Na PIV de embriões bovinos (Etapa 4), um total de 284 oócitos foi submetido à MIV, atingindo uma taxa de maturação *in vitro* de 60% (170/284), variando de 52% a 66% (Tabela 6). As taxas de fecundação (18 hpf), observadas após fixação e coloração das estruturas nas duas rotinas, foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos oócitos sem ZP (15/38, 39,5%) do que em oócitos com ZP submetidos à FIV convencional (9/40, 22,5%). As taxas de clivagem (Dia 2 de desenvolvimento, 48 hpf), foram determinadas somente em uma das repetições e foram semelhantes entre os grupos de FIV (Tabela 6). O controle da ativação oocitária, caracterizada pela presença de 1 pronúcleo (1PN) nos

partenotos (13/31, 41%), foi averiguado após a fixação e coloração com Hoechst 33342, no mesmo momento (18 hpf) da determinação da taxa de fecundação dos oócitos

submetidos à FIV. A comparação entre as duas rotinas é apresentada na Tabela 6.

Tabela 5. Média (%) de espermatozoides de três touros bovinos apresentando indução da capacitação com 10 UI/mL de heparina e de reação acrossômica após a incubação com diferentes concentrações de cálcio ionóforo (A23187)

Características espermáticas	Touros	Segregação Percoll (%) 2h (t2) Controle	Indutor da reação (%)	
			0,1 μ M	1 μ M
Não capacitados	A	11 ^{aA}	12 ^{aA}	11 ^{aA}
	B	16 ^{aA}	11 ^{aA}	16 ^{aA}
	C	15 ^{aA}	7 ^{aA}	12 ^{aA}
Capcitados	A	77 ^{aA}	31 ^{bB}	30 ^{aB}
	B	78 ^{aA}	35 ^{bB}	29 ^{aB}
	C	73 ^{aA}	50 ^{aB}	41 ^{aB}
Acrossomas reagidos	A	12 ^{aB}	57 ^{aA}	59 ^{aA}
	B	6 ^{Ab}	54 ^{abA}	55 ^{aA}
	C	12 ^{aB}	43 ^{bA}	47 ^{aA}

^{a-c}: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

^{A,B}: Letras diferentes em cada linha diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

A avaliação da fecundação pela presença de pronúcleos e *status* da configuração da cromatina às 18 hpf são apresentadas na Tabela 6. O grupo de partenogênese apresentou 41% (13/32) de estruturas com um pronúcleo (1PN), ou seja, ativadas, com uma taxa de 53% (17/32) de oócitos não ativados, contendo cromatina configurada em MII. A taxa de fecundação averiguada pela presença de dois pronúcleos (2PN) nos oócitos submetidos à FIV diferiu ($p < 0,05$) entre os grupos de oócitos submetidos à FIV com (24%) ou sem ZP (40%; Figura 10). No entanto, não houve diferença significativa quanto à presença de cromatina em MII entre os dois grupos de FIV, indicando a não ativação embrionária, apresentando taxas de 40% (16/40) para a FIV com ZP e 32% (18/38) para a FIV sem ZP (Figuras 10 e 11). Dentro destas taxas, observamos que 20% (8/40) dos oócitos com ZP e 8% (3/38) dos oócitos sem ZP foram fecundados,

apresentando o desenvolvimento do PN masculino, mas sem o desenvolvimento do PN do oócito, apresentando a cromatina em MII, com ambos os grupos apresentando taxas semelhantes de 1PN no ooplasma (7/40, 18% e 10/38, 26%, respectivamente).

Tabela 6. Resultados preliminares de produção *in vitro* de embriões bovinos pela avaliação de taxas de fecundação e de clivagem após ativação partenogenética de oócitos maturados intactos (com zona pelúcida) e FIV de complexos *cumulus*-oócitos maturados intactos e oócitos maturados sem zona pelúcida

Repetições	Oócitos em MIV	Oócitos em MII n (%)	Partenotos Ativação n (%)	FIV			FIV	
				Convencional			Oócitos sem ZP	
				Fecundação n (%)	Clivagem n (%)	Fecundação n (%)	Clivagem n (%)	
1	120	62 (52) ^b	7/9 (77) ^{aA}	6/22 (27) ^{aC}	-	4/8 (50) ^{aB}	-	
2	164	108 (66) ^a	6/23 (26) ^{bB}	3/18 (16) ^{aB}	8/15 (52) ^A	11/30 (36) ^{bB}	9/14 (65) ^A	
Total	284	170 (60) ^a	13/31 (42) ^{bB}	9/40 (23) ^{aC}	8/15 (52) ^{AB}	15/38 (39) ^{bB}	9/14 (65) ^A	

^{a-c}: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

^{A,B}: Letras diferentes em cada linha diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

Tabela 7. Avaliação das configurações de cromatina em estruturas bovinas 18 h após a fecundação *in vitro* de oócitos com ou sem zona pelúcida

Fecundação e configuração da cromatina	Partenotos Total	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)			
		Oócitos com zona pelúcida		Oócitos sem zona pelúcida	
		Total	Não ativados	Total	Não ativados
Cromatina em MII	17/32 (53%) ^{aA}	16/40 (40%) ^{aAB}	8/40 (20%) ^A	18/38 (32%) ^{abB}	3/38 (8%) ^B
1 pronúcleo (1PN)	13/32(41%) ^{abA}	7/40 (18%) ^{bB}	-	10/38 (26%) ^{bB}	-
2 pronúcleos (2PN)	2/32 (6%) ^{cC}	9/40 (24%) ^{bB}	-	15/38 (40%) ^{cA}	-
Polispermia	-	7/40 (18%) ^{bA}	-	1/38 (2%) ^{cB}	-
Média de espermatozoides aderidos ao oolema	-	4	-	40	-

a,b,c: Números seguidos de superescritos diferentes em cada linha diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

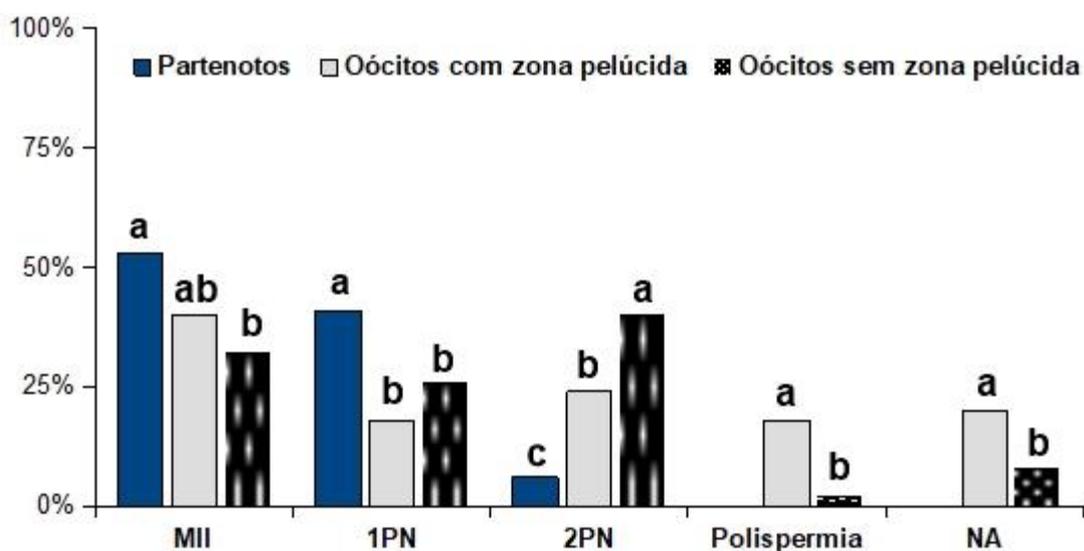


Figura 10. Avaliação das configurações de cromatina em estruturas bovinas 18 h após a fecundação *in vitro* de oócitos com ou sem zona pelúcida. ^{a,b}Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$). No eixo X estão as representações das porcentagens de ativação e/ou fecundação dos oócitos com e sem zona pelúcida: oócitos partenotos (representados por barras em azul), oócitos com zona pelúcida intacta (representados por barras em cinza-claro) e sem zona pelúcida (representados por barras em preto com cinza). No eixo Y as legendas dos grupos referentes a configuração de cromatina após 18 h da ativação e fecundação *in vitro* de oócitos com ou sem zona pelúcida: cromatina em metáfase II (MII), 1 ou 2 pró-núcleos (1PN e 2PN, respectivamente), oócitos não ativados mesmo com a entrada de um ou mais espermatozoides (NA).

Oócitos da FIV convencional (com ZP) apresentaram maior taxa de polispermia (7/40, 18%) do que o grupo de FIV sem ZP (1/38, 2%; Tabela 7; Figura 11; $p < 0,05$).

Na FIV dos oócitos sem ZP, após uso de uma concentração em torno de 100 espermatozoides por oócito, dos quais 49% reagiram perante o uso de 1 μM de cálcio ionóforo A23187, obteve-se uma taxa média de penetração espermática no ooplasma de 73% (28/38), independente do *status* da cromatina do espermatozoide, ou se houve ou não a formação dos pronúcleos. Curiosamente, encontrou-se 47% de espermatozoides aderidos ao oolema dos oócitos sem ZP, corroborando com a taxa de reação acrossômica. Porém, mesmo com múltiplos espermatozoides aderidos ao oolema, os dados preliminares indicam a entrada de apenas um único espermatozoide no oócito, ocorrendo falhas em alguns casos, reveladas por uma discreta taxa de polispermia. Em contraste, os

oócitos submetidos à FIV com ZP apresentaram em média 160 espermatozoides ligados à zona pelúcida, e uma média de quatro espermatozoides aderidos ao oolema, com taxa mais elevada de polispermia (7/40, 18%) do que o grupo de oócitos de FIV sem ZP (1/38, 2%).

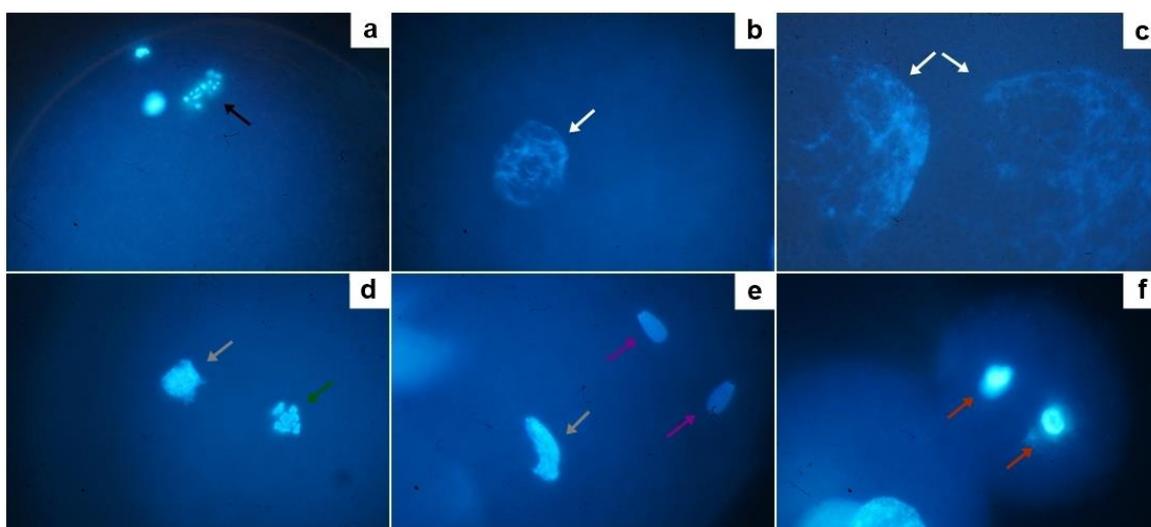


Figura 11. Imagens representativas de oócitos ativados partenogeneticamente ou fecundados *in vitro*. a) Oócito partenoto não ativado, seta preta indica presença da cromatina em metáfase II (MII). b) Oócito partenoto ativado, seta branca indica a presença de 1 pronúcleo (PN). c) Oócito sem zona pelúcida fecundado *in vitro*, seta branca indica a presença de 2 pronúcleos (PN). d) Oócito sem zona pelúcida fecundado *in vitro*, seta cinza indica a presença de material genético do espermatozoide em descondensação, seta verde indica a cromatina em metáfase II, sem ser ativado. e) Oócito sem zona pelúcida fecundado *in vitro*, seta cinza indica a presença de material genético do espermatozoide em descondensação e em roxas não descondensadas, indicando a penetração de mais de um espermatozoide no oócito. f) Putativo zigoto em cultivo *in vitro*, Dia 2 de desenvolvimento, setas em marrom indicam um blastômero com o material genético em estágio de telófase. Microscopia de epifluorescência, em bisbenzimidida (Hoechst 33342), sob magnitude de 1000X.

5.2 Experimento II

Seguindo a mesma tendência conforme observado no Experimento 1, no qual o ganhão A apresentou elevada mortalidade espermática, todos os cinco ganhões utilizados no Experimento II apresentaram significativas taxas de mortalidade após o processamento pelos métodos de *Swim up*, Mini-Percoll e após o período de incubação com 50 e 100 UI/mL de heparina, variando de 49% a 81%, 39% a 71%, 38% a 76%, 41 a 61% e 35 a 72%, respectivamente. No entanto, os ganhões D e E mantiveram maiores taxas de espermatozoides vivos ao longo da incubação em comparação com os outros

garanhões, e também se mostraram mais sensíveis ao tratamento com 50 e 100 UI/mL de heparina (Figura 10). Os garanhões A, B e C não responderam às concentrações de 50 e 100 UI/mL de heparina ao longo do período de incubação (Figura 10). Similar ao que foi observado no Experimento I, houve uma correlação negativa ($p < 0,05$) entre a mortalidade e as taxas de espermatozoides não-capacitados ($r = -0,703$), capacitados ($r = -0,738$) e com acrossoma reagido ($r = -0,437$). Curiosamente, o sêmen de garanhões com menor mortalidade espermática (D e E) também apresentaram maior resposta à indução da capacitação com 50 ou 100 UI/mL de heparina.

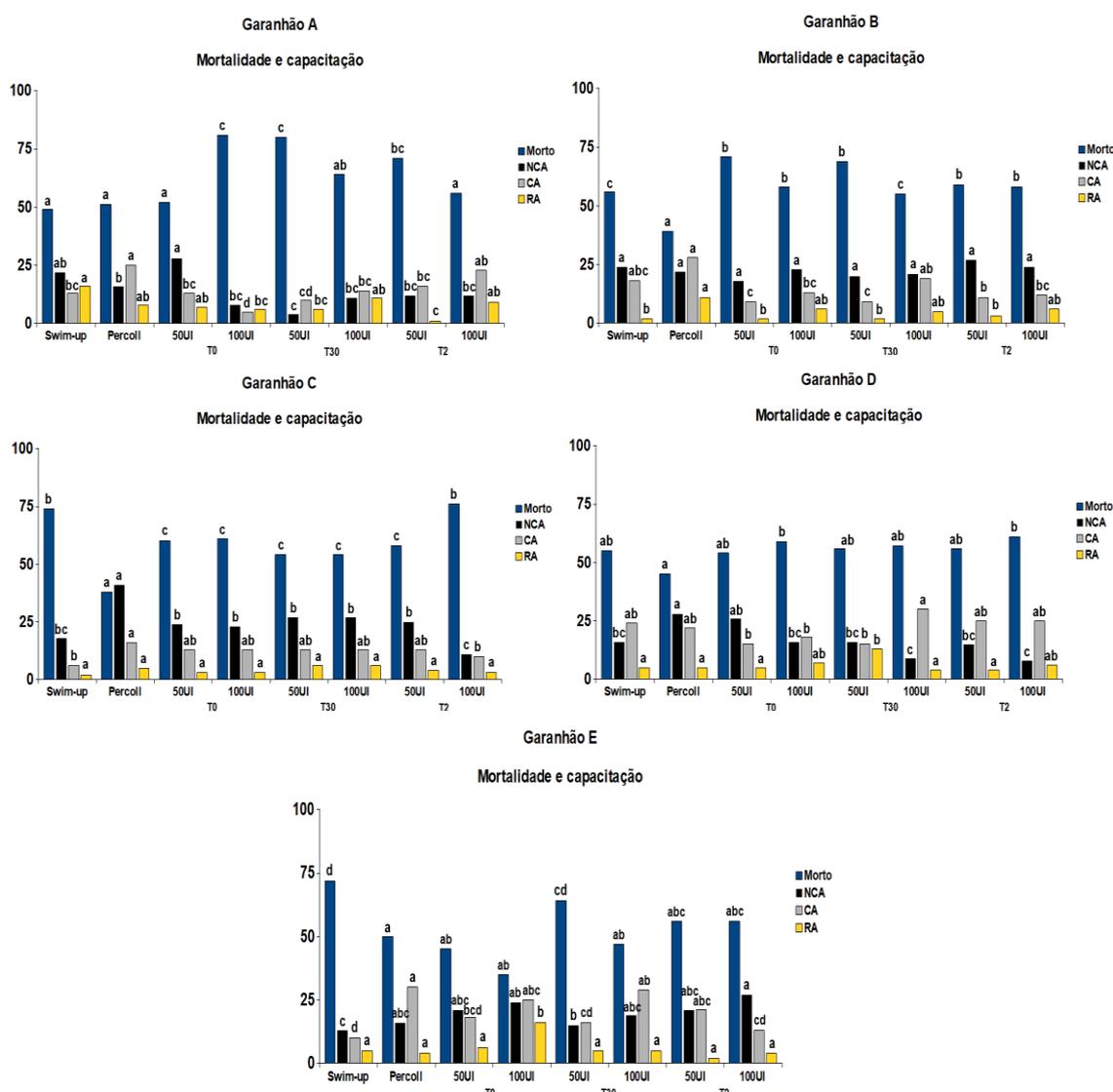


Figura 12. Taxas de capacitação espermática *in vitro* e viabilidade espermática do sêmen congelado de cinco garanhões (A, B, C, D, E) após incubação por 0 h (T0), 30 min e 2

h (T2) em 50 e 100 UI/mL de heparina. ^{a-d}: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$). No eixo X são apresentadas as representações das porcentagens de espermatozoides: vivos não-capacitados (representados por barras em preto e siglas “NCA”), vivos capacitados (representados por barras em cinza-claro e siglas “CA”) e vivos reagidos (representados por barras em amarelo e siglas “RA”). No eixo Y, são apresentadas as legendas dos métodos de segregação, tempos de incubação e distintas concentrações de heparina.

O sêmen dos dois garanhões (D e E) com maior resposta à heparina e menor mortalidade após a incubação foi submetido à indução da reação acrossômica. Apesar das proporções de espermatozoides capacitados e de reação acrossômica positiva serem baixas (entre 10 e 20%, e ao redor de 10%, respectivamente), o sêmen de ambos os garanhões respondeu de forma significativa após a indução da capacitação com 100 UI/mL de heparina e indução da reação acrossômica com 0,1 e 1 μM de cálcio ionóforo, quando comparamos a proporção de espermatozoides reagidos sobre os capacitados (entre 52 e 67%, Tabela 8), mostrando que mais da metade dos espermatozoides que capacitam após a segregação por Mini-Percoll e período de incubação com a heparina respondem ao indutor da reação acrossômica.

Tabela 8. Média (%) de espermatozoides equinos com indução da capacitação com 100 UI/mL de heparina e da reação acrossômica após a incubação com diferentes concentrações do cálcio ionóforo (A23187)

Características espermáticas	Garanhões	Segregação Percoll (%)	Indutor da reação (%)	
			Cálcio Ionóforo	
		2h (t2) Controle	0,1 μM	1 μM
Mortos	D	70,0 ^{aBC}	57,0 ^{aAB}	72,6 ^{aC}
	E	81,0 ^{aB}	61,2 ^{aA}	77,0 ^{aB}
Não capacitados	D	6,9 ^{aA}	10,2 ^{aA}	8,3 ^{aA}
	E	2,9 ^{aA}	7,0 ^{aA}	4,1 ^{aA}
Capacitados	D	17,5 ^{aAB}	21,4 ^{aAB}	11,4 ^{aB}
	E	10,5 ^{aA}	20,9 ^{aA}	11,4 ^{aA}
Acrossomas reagidos	D	6,8 ^{aA}	11,4 ^{aA}	7,6 ^{aA}
	E	5,6 ^{aA}	10,9 ^{aA}	7,5 ^{aA}
Reagidos/Capacitados	D	37,7 ^{bA}	53,7 ^{aB}	66,6 ^{aB}
	E	53,3 ^{aA}	52,0 ^{aB}	65,8 ^{aB}

^{a-c}: Números diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

^{A,B}: Números diferentes em cada linha diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, devido a atual inexistência de um agente capacitante específico para a espécie equina (LEEMANS *et al.*, 2019), distintas concentrações de heparina foram utilizadas para induzir a capacitação espermática em amostras de sêmen congelado de equínos, uma vez que a eficiência desse agente indutor já foi demonstrada há mais de três décadas por Parrish *et al.* (1986) na espécie bovina. Entretanto, o uso da heparina para a capacitação espermática de sêmen *in natura* ou congelado de equinos, com a subsequente FIV de oócitos maturados *in vitro* de equinos, já foi demonstrada ineficiente, com baixíssima taxa de clivagem, quando existente (DELL'AQUILA *et al.*, 1996; DELL'AQUILA *et al.*, 1997a,b; ALM *et al.*, 2001; ROASA *et al.*, 2007). Porém, tais estudos foram realizados em um período anterior ao maior conhecimento dos processos de MIV de oócitos equinos e de CIV de embriões equinos, e mesmo antes do atual maior domínio da PIV de embriões equinos pela ICSI ou pela clonagem por TN. Em adição, o conhecimento das possíveis barreiras à FIV equina incluem não somente aspectos de falhas de indução de capacitação *in vitro*, mas também o fenômeno de *zona hardening* (DE FELICI; SIRACUSA, 1982; DELL'AQUILA *et al.*, 1999; LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2001). Desta forma, as falhas de obtenção de fecundação, clivagem e desenvolvimento embrionário *in vitro* em equinos em quaisquer protocolos de relatos científicos anteriores a 2010 devem ser tidos com cautela, visto muitas das falhas estarem potencialmente associadas a fatores não necessariamente relacionados ao fenômeno da capacitação *per se*. Assim, propusemos neste estudo o uso de um protocolo de capacitação e reação acrossômica *in vitro*, conforme já estabelecido e conhecido para a espécie bovina (PARRISH, *et al.*, 1986; TRIANA *et al.*, 1980), adequando as condições para o sêmen congelado de distintas espécies com conhecida menor eficiência na PIV pela FIV, como a bubalina, a ovina e a caprina, para em seu final, avaliar a eficiência para o sêmen congelado de distintos garanhões. O protocolo utilizando a heparina e o cálcio ionóforo (A23187), adaptado da espécie bovina, foi efetivo na indução da capacitação espermática e da reação acrossômica *in vitro* do sêmen congelado equino, havendo uma alta correlação negativa entre a taxa de capacitação e a sobrevivência espermática nas quatro espécies testadas. Inferimos, portanto, que um dos aspectos mais limitantes para o

uso de espermatozoides equinos capacitados para a FIV seja de fato a elevada mortalidade do sêmen equino congelado após a incubação (57 a 81%), uma vez definidas condições e meios mais apropriados para a manipulação e incubação *in vitro* de espermatozoides de sêmen *in natura*, resfriado ou congelado na espécie equina.

Parrish *et al.* (1985), usando a heparina (10 µg/mL) para capacitar espermatozoides de sêmen bovino *in natura* após um período de 6h de incubação, obtiveram taxas próximas de 70% de penetração/fecundação em oócitos maturados *in vitro* (PARRISH; SUSKO-PARRISH; FIRST, 1985). Adaptando o procedimento usado no sêmen *in natura*, Parrish *et al.* (1986) trataram o sêmen congelado com heparina (10 µg/mL) para induzir a capacitação por um período de 15 min, devido a baixa viabilidade do sêmen após o processo de criopreservação, obteve taxas semelhantes de penetração/fecundação em oócitos maturados *in vitro*. Desde então, o protocolo de indução de capacitação *in vitro* de espermatozoides com heparina se tornou padrão-ouro na espécie bovina, sendo utilizado em todo o mundo, pela vasta maioria dos laboratórios de PIV de embriões pela FIV em bovinos (PARRISH, *et al.*, 1986; PARRISH, 2014). Frente a isso, na etapa 1 e 2, do Experimento I, observamos que os espermatozoides bovinos congelados apresentaram taxas próximas a 70% de capacitação espermática após a incubação de 2 h com heparina, corroborando com os achados clássicos de Parrish *et al.* (1986; 1988), validando nosso protocolo em termos científicos. Da mesma forma, os resultados da indução da capacitação espermática no modelo bovino, no Experimento I, demonstraram um comportamento distinto entre os touros frente à indução com 5 UI/mL de heparina, com um dos touros (C) mostrando-se mais sensível ao agente capacitante, enquanto que os demais (touros A e B) não apresentaram resposta significativa na taxa de capacitação em resposta à concentração de 5 UI/mL de heparina. No entanto, o touro A passou a responder à heparina em concentrações mais elevadas (10 e 15 UI/mL), enquanto o touro B não respondeu a nenhum dos tratamentos com heparina. Tais achados sobre a diferença individual de distintos touros frente à indução da capacitação *in vitro* pela heparina corroboram com dados anteriores (BLOTTNER; NEHRING; TORNER, 1990; FOLHADELLA, 2008), sob protocolos padrão de manipulação.

Após o descongelamento das doses de sêmen e a segregação espermática por *swim up* observamos uma elevada taxa de capacitação espermática *espontânea*

(criocapacitados). A espécie bovina foi a que apresentou a maior proporção de espermatozoides capacitados após o descongelamento (51 a 63%) em comparação as outras espécies (6 a 20%) utilizadas neste estudo. Interessantemente, isto demonstra que alguns touros podem apresentar taxas significativas de capacitação sem a influência da heparina e que somente o simples processamento pelo *swim up* ou mini-Percoll já gera um número suficiente de células capacitadas que permitiriam taxas variáveis de fecundação *in vitro*. Logo, observamos comportamento diferente entre os reprodutores dentro de uma mesma espécie frente à substância indutora da capacitação, possível fato de que nem todos os touros submetidos ao processo de FIV apresentam bons resultados quanto à PIV de embriões, corroborando a literatura (BLOTTNER; NEHRING; TORNER, 1990; FOLHADELLA, 2008), e que os ajustes na concentração de heparina podem estar diretamente relacionados ao aumento no número de células capacitadas (PARRISH, 2014). Isto denota que, se mesmo na espécie bovina, na qual os protocolos de PIV de embriões são muito bem estabelecidos, há desde a facilitação do processo pela capacitação *espontânea*, até a necessidade por vezes de otimizar os tratamentos do sêmen de determinados touros para uso mais eficiente na FIV. Também denota que tais variações individuais certamente existem e possivelmente devam ser ainda maiores do que a observada em bovinos, conforme observamos nos resultados nas demais espécies e indivíduos avaliados neste estudo, visto não haver protocolos tão bem definidos para os mesmos procedimentos *in vitro*.

Após observarmos as respostas dos três touros a distintas concentrações de heparina, elegemos a concentração de 10 UI/mL de heparina como padrão para o processamento e indução da capacitação no sêmen bovino criopreservado para o procedimento de FIV em nosso laboratório. Como a heparina é um dos componentes comumente ajustados no momento em que touros são testados para a FIV (PARRISH, 2014) e como o uso de variações na concentração de heparina normalmente não é seguido da avaliação *ipso facto* da taxa de capacitação espermática *in vivo* por coloração e microscopia, os resultados alcançados após a FIV com tais reprodutores passa a ser presuntivo. É bem possível que em muitos destes casos, na dependência do indivíduo, do ejaculado e das condições gerais da FIV, a heparina não tenha efeito sobre as taxas de

fecundação subsequentes, sendo significativa em outros casos. Tais considerações ainda merecem maiores investigações científicas.

A sobrevivência espermática após o descongelamento revelou que a espécie bovina possuía uma reduzida mortalidade (6 a 12%) em comparação as outras espécies (bubalino, 68%; caprino, 43%; equino, 55%; ovino, 57%). As baixas taxas de mortalidade dos espermatozoides bovinos corroboram os dados descritos na literatura (ASSUMPCÃO *et al.*, 2002; RIBEIRO-PERES *et al.*, 2014; BARRIGA, 2019). Adotamos o método de *swim up* para a segregação espermática após o descongelamento, ao invés da metodologia de lavagem por centrifugação, porque estudos comparativos entre técnicas de segregação indicaram que a lavagem causou efeitos prejudiciais, à sobrevivência, à motilidade, à integridade da membrana plasmática e à fragmentação de DNA das células espermáticas, devido a um aumento da geração e liberação de espécies reativas de oxigênio (EROS) (KIM; AGCA; AGCA, 2013; PENARIOL, 2017).

O sêmen de ruminantes possui semelhanças entre si, assim diversos fatores referentes à PIV de embriões podem ser correlacionados eficientemente. O uso da heparina, muito utilizada na espécie bovina, como mencionado acima, mostrou-se também eficiente na indução da capacitação *in vitro* em espermatozoides caprinos e ovinos recém coletados (frescos), alcançando taxas de penetração em oócitos que variam entre 73 a 90% (COX; SARAVIA, 1992; COX *et al.*, 1995; IZQUIERDO, VILLAMEDIANA, PARAMIO, 1999). Outra influência da heparina é sobre o aumento da reação acrossômica espontânea nessas espécies de acordo com a literatura, na qual observam-se taxas médias de 47% em sêmen congelado e 51% em sêmen fresco na espécie caprina e ovina, e 56% em sêmen bubalino congelado (COX; SARAVIA, 1992; COX *et al.*, 1995; IZQUIERDO, VILLAMEDIANA, PARAMIO, 1999; KADIRVEL, KATHIRAVAN, KUMAR, 2011). O uso da heparina para induzir a capacitação espermática na espécie equina apresenta dados controversos na literatura, pois de acordo com Alm *et al.* (2001), a heparina exerce efeito sobre a capacitação do sêmen fresco e congelado equino, aumentando as taxas de reação acrossômica em ambos (62% e 25%, respectivamente), enquanto que de acordo com e Tremoleda *et al.* (2003) a heparina não exerceu o mesmo efeito sobre a capacitação no sêmen equino, com a ressalva desses dados ainda serem antigos e controversos na espécie equina. No entanto, ao serem

comparadas ao bovino, tais espécies demonstraram uma resposta ineficiente à heparina, mesmo a espécie caprina. Possivelmente, tais diferenças observadas entre as espécies utilizadas pode estar relacionada ao fator macho, visto que usamos apenas um macho de cada espécie, com exceção dos bovinos e equinos, nos quais observamos que há uma variabilidade na resposta dos machos à heparina. Assim, a não resposta das demais espécies ruminantes deste estudo à heparina pode estar relacionada intrinsecamente aos machos, e ao fato de havermos utilizado sêmen congelado. Neste sentido, observamos que todas as amostras congeladas de sêmen das espécies submetidas à incubação com heparina apresentaram uma significativa mortalidade desde o início do processamento das amostras, com alguns espécimes aumentando após o período de incubação, com exceção da espécie bovina e, em menor intensidade, na espécie caprina. De acordo com Olivares *et al.* (2019), a alta mortalidade espermática pode ser explicada como resultado das alterações e danos durante o processo de criopreservação causados à membrana plasmática e à perda de fosfolípidos, o que induz um estado semelhante à capacitação, denominado de criocapacitação (OLIVARES *et al.*, 2019). Ao final, o processo leva a um aumento de EROs por elevada atividade mitocondrial ou lesão nas mitocôndrias, que pode aumentar o dano estrutural espermático, causando ainda mais alterações nas membranas por lipoperoxidação e no DNA, que promovem a perda da viabilidade do gameta (BURNAUGH; SABEUR; BALL, 2007; VALENÇA; GUERRA, 2007; KOTHARI *et al.*, 2010; NOGUEIRA *et al.*, 2014).

Uma maior mortalidade espermática era esperada, em especial, na espécie equina, pois dentre as espécies em estudo, esta é a que revela maior sensibilidade dos gametas aos efeitos da criopreservação (BALL; VO; BAUMBER, 2001). De acordo com Squires e Squires (2003), Burnaugh, Sabeur e Ball (2007) e Samper, Pycock e Mckinnon (2007), o uso de substâncias indutoras da capacitação e reação acrossômica *in vitro* em equinos diminui a sobrevivência de espermatozoides *in vitro*, além de ser a espécie que mais gera EROs no sêmen. Além disto, Watson (2000) havia relatado que 40% a 60% dos espermatozoides preservaram a motilidade após a criopreservação, porém apenas 20% a 30% revelam integridade estrutural, permanecendo biologicamente ativos. De acordo com Rambo (2008), outro fator que também altera as membranas espermáticas é a rápida passagem dos crioprotetores, o que causa o fenômeno conhecido como estresse osmótico.

O estresse osmótico depende do tipo de crioprotetor, bem como da concentração, da temperatura de adição, e do tempo de exposição. Interessantemente, observamos uma forte correlação negativa entre as taxas de mortalidade e as proporções de espermatozoides vivos não-capacitados, capacitados e reagidos nas espécies bubalina, caprina, equina e ovina ($r = -0,70$). Relações de causa-e-efeito neste aspecto ainda necessitam ser elucidadas.

Na terceira etapa do Experimento I, os espermatozoides dos três touros (A, B e C) testados apresentaram uma resposta significativa ao cálcio ionóforo (A23187), apresentando percentuais semelhantes de reação acrossômica após o uso de duas concentrações distintas de ionóforo (0,1 e 1 μM ; $p < 0,05$), corroborando com resultados da literatura (TRIANA *et al.*, 1980; WHITFIELD; PARKINSON, 1995; GATENBY; BONDIOLI, 2019).

Os resultados preliminares de dois ensaios de fecundação *in vitro* com oócitos bovinos sem zona pelúcida e espermatozoides bovinos com acrossoma reagido demonstraram que o espermatozoide bovino é capaz de aderir, fecundar/fundir e ativar os oócitos após serem submetidos à indução da capacitação espermática e à reação acrossomal *in vitro* pelo protocolo utilizado neste estudo. Nossos resultados preliminares corroboram estudos anteriores, que o emprego de oócitos sem zona pelúcida é uma ferramenta útil para ensaios de adesão e fusão/penetração espermática (YANAGIMACHI, 1972; YANAGIMACHI; YANAGIMACHI; ROGER, 1976). Whitfield e Parkinson (1995) provaram que espermatozoides bovinos respondem à 1 μM o cálcio ionóforo (A23187), após 1 h de incubação, apresentando taxas médias de 38,9 a 41,5% de acrossomas reagidos. Tais taxas, descritas acima, foram semelhantes ao que observamos de reação acrossômica nos touros na terceira etapa deste experimento, que variavam de 47 a 59%, e de fecundação *in vitro* observadas na quarta etapa. Em outro estudo, Landim-Alvarenga *et al.* (2001) relatara que o uso de dilauroilfosfatidilcolina (PC12) ou cálcio ionóforo (A23187) foram eficazes em induzir a capacitação e a reação acrossômica de sêmen fresco equino ($n=3$) e bovino ($n=1$), observando taxas de penetração de espermatozoides em oócitos sem zona pelúcida de hamster de 56 e 83% (17/30 e 25/30), de bovinos de 13 e 83% (4/30 e 25/30) e de equinos de 71 e 66% (15/21 e 12/18), respectivamente, mas as taxas de polispermia e de comprovação da fecundação

per se, a presença dos pronúcleos, não foram apresentadas, uma vez que eles fizeram o uso de oócitos sem zona pelúcida para avaliar a eficiência do uso dos indutores. As taxas de penetração foram parecidas com as que encontramos neste trabalho. Nós realizamos a avaliação das taxas de penetração através da coloração de Hoechst e consideramos todos os espermatozoides presente no interior do oolema do oócito, enquanto que Landim-Alvarenga *et al.* (2001), fizeram o uso da coloração com orceína acética e consideraram somente os espermatozoides em descondensação, visto que devido a baixa qualidade visual que a orceína acética proporciona não se consegue diferenciar os espermatozoides que estão dentro ou fora do oócitos. Embora houvesse a penetração, eles não comprovaram a fecundação e se o protocolo utilizado por eles permitia o desenvolvimento subsequente após a indução da capacitação e reação acrossômica *in vitro*, conforme relatamos. No entanto, em nenhum desses estudos houve a indução da capacitação espermática e da reação acrossômica com o uso de agente (heparina e cálcio ionóforo) separadamente para cada processo, assim como a observação do *status* de cromatina após a fecundação (2 PN) como no presente trabalho.

Neste estudo, o sêmen bovino apresentou taxas de capacitação que variaram de 73% a 78% e de reação acrossômica de 47% a 59%. Frente a isso, ao utilizarmos em torno de 100 espermatozoides por oócito sem ZP, observamos uma média de 40 espermatozoides aderidos à membrana após a FIV, número curiosamente semelhante às taxas observadas de reação acrossômica que obtivemos, considerando-se que houve uma mortalidade espermática de 10 a 15%, e que em torno de 50% dos espermatozoides vivos apresentavam acrossoma reagido (cerca de 40% do total dos espermatozoides). Já nos oócitos de FIV com ZP (FIV convencional), para os quais utilizamos cerca de 5 mil espermatozoides viáveis por oócito na FIV, houve em média mais de 150 espermatozoides ligados à zona pelúcida. Entretanto, o número médio de espermatozoides ligados à membrana dos oócitos no espaço perivitelínico era de apenas quatro. Interessantemente, o grupo de FIV com oócitos com ZP apresentou taxas maiores de polispermia, quando comparado ao de FIV com oócitos sem zona pelúcida. Estes dados diferem do que é observado na literatura, uma vez que a zona pelúcida é tida como a maior barreira à polispermia, impedindo a fecundação do oócito por diversos

espermatozoides (HANADA; CHANG 1976; VELÁSQUEZ *et al.*, 2013). Sendo assim, a polispermia não deveria ocorrer em maior frequência no procedimento de FIV convencional em bovinos, e sim, no grupo sem ZP. Na FIV de suínos, é conhecido que o fenômeno da polispermia é bastante comum, sendo um dos principais problemas na implementação da FIV nesta espécie (SJUNNESSON, 2019). Também sabe-se que quando a zona pelúcida é removida, a especificidade à fecundação é reduzida (YANAGIMACHI, 1984), permitindo que os espermatozoides entrem em grande quantidade no citoplasma do oócito (HANADA; CHANG, 1976; BARROS *et al.*, 1979; KUMAR *et al.*, 2013). Os resultados de elevada monospermia neste estudo ainda necessitam ser melhor confirmados por repetições do procedimento.

Curiosamente, não observamos com frequência a presença de múltiplos espermatozoides dentro do citoplasma dos oócitos sem zona pelúcida. Assim, algumas possíveis explicações podem ser baseadas nos mecanismos secundários de bloqueio à polispermia, ou então à falha no mecanismo da fecundação, pois a remoção da zona pelúcida pelo uso de uma protease pode comprometer a estrutura das proteínas de adesão (VLA-6/ α 6 β 1, CD9) e de fusão (Juno, CD9) presentes no oolema do oócito. Também propomos que a indução da reação acrossômica pode também não conferir eventos fisiológicos, por exemplo, de translocação adequada das proteínas na superfície do espermatozoide (IZUMO), em especial na zona equatorial (SATOUEH *et al.*, 2012). Outra explicação pode estar associada à liberação prematura do conteúdo dos grânulos corticais, no qual há a presença de diversas proteases, que por sua vez podem ter alterado a estrutura das proteínas de adesão e fusão, impedindo a adesão e fusão de outros espermatozoides (HOODBHOY; TALBOT, 1994; GROSS *et al.*, 2000). Porém, não presumimos que tais mecanismos afetem a adesão, pois após decorridas as 18 h de FIV, um significativo número de espermatozoides (em média 40) se encontrava aderidos à membrana do oócito. Tal achado corrobora a visão do fenômeno da fecundação, proposta por Bianchi *et al.* (2014a). A adesão do primeiro espermatozoide à membrana desencadeia a ativação do oócito que por sua vez leva à extrusão dos grânulos corticais, que, por fim, leva à modificação enzimática da principal proteína de fusão das membranas do oócito, o receptor Juno (HOODBHOY; TALBOT, 1994; GROSS *et al.*,

2000). Após a fecundação de oócitos de camundongos, o receptor Juno passa a ser removido da membrana plasmática dos oócitos sob a forma de vesículas em cerca de 1 h, tempo ainda menor quando o ensaio de FIV é realizado com oócitos sem ZP, sendo em média de 30 a 40 min (BIANCHI *et al.*, 2014a). Assim, durante este intervalo de tempo, o bloqueio à polispermia ocorre pela despolarização de membrana induzida pelo Ca^{2+} após a ativação pelo espermatozoide (BERRIDGE, 1993; GRUPEN; NOTTLE; NAGASHIMA, 2002), seguido da clivagem das proteínas de fusão pelas proteases dos grânulos corticais que foram extrusados, não afetando a capacidade de adesão de novos espermatozoides, os quais permanecem aderidos, mas não se fundem ao oolema. Frente a isto, pode-se inferir das razões de encontrarmos uma baixa taxa de polispermia nos oócitos sem zona pelúcida, com uma elevada contagem de espermatozoides aderidos ao oolema, em número proporcional aos espermatozoides com acrossoma reagido utilizados para a FIV.

Neste estudo, a ativação partenogenética dos oócitos com ZP serviu como um controle negativo da ativação dos oócitos *in vitro*, sem a participação dos espermatozoides, e da configuração panorâmica da cromatina desses oócitos ativados após 18 h. A observação destas configurações permitiu seguir um padrão de oócitos não ativados, apresentando uma configuração de cromatina no estágio da segunda fase da meiose (MII), e um padrão de ativados, apresentando um pronúcleo, que serviram para as análises observacionais que foram realizadas nos oócitos de FIV com e sem zona pelúcida. A presença de um pronúcleo foi frequentemente observada em diversos oócitos ativados partenogeneticamente, conforme esperado, demonstrando que os oócitos eram competentes. Entretanto, em alguns oócitos ativados observamos a presença de dois pronúcleos dentro do citoplasma de um único embrião. Inferimos que tais oócitos apresentaram a segregação cromossômica, sem a extrusão do segundo corpúsculo polar, conferindo uma estrutura diploide, especialmente por não haver sido realizado neste estudo um bloqueio com inibidores de quinases ou de síntese proteica, comumente utilizados na clonagem para bloquear o MPF após a ativação embrionária. Nos grupos de FIV, os oócitos com zona pelúcida apresentaram uma elevada taxa de estruturas em MII (40%), ou seja, não foram fecundados ou não foram ativados. Dentro desta classificação,

observamos que em 20% destes oócitos houve a penetração de espermatozoides com alguns se descondensando, mas não progredindo ao estágio de pronúcleo, sem a devida ativação, havendo uma falha do mecanismo de ativação dos oócitos, que permaneceram em MII. Taxas semelhantes de estruturas em MII (32%) foram observadas nos oócitos de FIV sem zona, porém a taxa de oócitos penetrados e não ativados foi menor (3/38, 8%). De acordo com Chaves *et al.* (2010), causas comuns de falha na ativação de oócitos de ruminantes em completar a meiose *in vitro* após a fecundação não são sempre determinadas ou conhecidas, podendo estar relacionadas a alterações nos mecanismos bioquímicos envolvidos no processo meiótico. Oócitos humanos com falha de ativação após a FIV apresentaram anormalidades no fuso em metáfase II (MII), com alta probabilidade de estagnação da meiose (CHAVES *et al.*, 2010).

Mesmo após a fecundação, falhas na ativação podem ocorrer e impedir a formação dos pronúcleos, com conseqüente descondensação da cromatina do espermatozoide, podendo ser defeito inerente à fertilidade do macho, como à deficiência ou à inabilidade da PLC-zeta do espermatozoide de ser liberada no ooplasma, causando falha de fecundação (DOZORTSEV *et al.*, 1995; MRAZEK; FULKA, 2003; CHAVES *et al.*, 2010). Outras falhas, como a não extrusão do segundo corpúsculo polar, podem ocorrer devido a erros na organização e na localização do fuso; após ativação partenogénica, tais oócitos podem clivar e apresentar dois pronúcleos, com apenas um corpúsculo polar (MRAZEK; FULKA, 2003). Interessantemente, tais resultados corroboram a baixa taxa de polispermia que observamos em oócitos sem zona pelúcida. Lonergan e Fair (2016) afirmaram que cerca de 90% de oócitos aspirados atingem o estágio de MII após a maturação *in vitro*; destes, cerca de 80% são fecundados *in vitro*, ratificando as observações de Parrish *et al.* (1986), o que determina uma taxa média de 72% de clivagem. Esta taxa média de clivagem é observada em rotinas funcionais de FIV em bovinos em nosso laboratório. Entretanto, observamos no ensaio de FIV neste estudo taxas de fecundação (penetração espermática no oócito) abaixo da metade do que estes autores haviam mencionado, com o grupo de FIV com zona apresentando 24%, enquanto o grupo de FIV sem zona chegou a aproximadamente 40%. Esperávamos taxas mais elevadas de fecundação neste grupo sem zona, devido à remoção da zona pelúcida e, conseqüentemente, ao aumento na polispermia. Contudo, as taxas de polispermia foram

menores neste grupo, com as de clivagem sendo parecidas entre os grupos de FIV. Embriões clivados e não clivados foram avaliados pela coloração de Hoechst no Dia 2 de desenvolvimento para a visualização dos núcleos e determinação da relação de núcleos por blastômero, para a visualização de possíveis figuras anormais da cromatina nestes putativos zigotos. Em tais observações, encontramos um único núcleo por blastômero, com aqueles com mais de dois núcleos apresentando características de divisão mitótica, em diversos estádios da mitose celular, como o exemplo expresso na Figura 11, onde observamos um blastômero em fase de telófase. Algumas das avaliações não foram possíveis de serem analisadas, os quais classificamos como formas anormais ou *esdrúxulas* (dados não apresentados). Assim, as taxas dos FIV sem ZP foram semelhantes às observadas nos partenotos, o que sugere que, mesmo que as taxas tenham sido relativamente baixas, os oócitos sem zona pelúcida utilizados nesse ensaio se mostraram competentes e os espermatozoides com reação acrossômica induzida aptos à fecundação.

A resposta do sêmen equino à heparina na indução da capacitação possui resultados bastantes contraditórios na literatura (FLEET *et al.*, 1995; LI *et al.*, 1995, ALM *et al.*, 2001; TREMOLEDA *et al.*, 2003). De um lado, a espécie equina possui uma inabilidade dos espermatozoides passarem pela zona pelúcida na FIV devido ao uso de protocolos ineficientes de indução da capacitação e da reação acrossômica (TREMOLEDA *et al.*, 2003). No presente trabalho, observamos respostas significativas de dois garanhões a doses mais elevadas de heparina após 2 h de incubação ($p < 0,05$), corroborando os resultados obtidos por Alm *et al.* (2001), no qual os autores demonstraram que o espermatozoide equino recém coletado (fresco) e congelado capacitam frente à indução com 10 ng/mL de heparina após 4,5 h de incubação. Entretanto, nossos dados diferem quanto à mortalidade, já que Alm *et al.* (2001) observaram mais de 60% de células viáveis após o período de incubação de sêmen fresco e congelado de dois garanhões, contrastando com nosso estudo, onde observamos estruturas com mortalidade variando de 49 a 74%, de acordo com o garanhão testado. Neste estudo, optamos pelo uso de 2 h de avaliação devido à baixa sobrevivência observada já no Experimento I com o sêmen de um dos garanhões, o qual, mesmo no Experimento II, não resultou em resposta a doses maiores de heparina, mantendo uma alta mortalidade espermática.

O sêmen congelado dos garanhões apresentou elevadas taxas de mortalidade quando comparado ao sêmen congelado bovino e caprino ($p < 0,05$). Esta maior mortalidade foi observada já imediatamente após o descongelamento, mantendo-se após o sêmen equino ser segregado pelo método de mini-Percoll e ao longo da incubação com a heparina. Existem variações na criotolerância e no comportamento dos espermatozoides entre garanhões individuais e até mesmo entre o sêmen do mesmo reprodutor (TISCHNER, 1979), assim, essas variações do sêmen equino, de acordo com Amann (1989), pode ser relacionada à diferença na composição proteica do plasma seminal entre os indivíduos e a variação sazonal (BLOTTNER *et al.*, 2001; HARTWIG *et al.*, 2014), o que corrobora com o que foi observado nos Experimentos I e II, com o sêmen bovino e o equino, respectivamente. Neste experimento (II), observamos que os três garanhões (A, B e C) não responsivos à heparina apresentaram taxas de mortalidade mais elevadas daquelas observada nos dois garanhões (D e E) que responderam à heparina. Sendo assim, estes últimos apresentaram maior proporção de células vivas ao longo do período de incubação. Devido a isso, faz-se necessário o aumento no número de indivíduos a serem testados.

Uma correlação negativa foi observada entre as taxas de mortalidade e as taxas de espermatozoides vivos não-capacitados, vivos capacitados e vivos com acrossomas reagidos. Com a resposta à heparina, os espermatozoides capacitam, ocorrendo um aumento dos níveis de cálcio intracelular, de EROs e da atividade tirosina quinase, levando a uma maior produção de AMPc. Estes eventos induzem o espermatozoide a um estado de hiperativação. Sob tais condições, o espermatozoide passa pelo processo de reação acrossômica induzida pela ZP3, adquirindo a habilidade de fecundar (AITKEN, 1995; LAMIRANDE *et al.*, 1997; SAALU, 2010). No entanto, o processo de criopreservação aumenta a suscetibilidade do espermatozoide equino à lipoperoxidação com o aumento de EROs, levando à morte (NOGUEIRA *et al.*, 2014; LUCIO *et al.*, 2016). Isto explicaria a correlação negativa entre as variáveis descritas acima, ou seja, enquanto os espermatozoides não-capacitados acabam capacitando e, por fim, reagem. Assim, a desestabilização da membrana plasmática do espermatozoide durante a capacitação pode levar à morte celular, aumentando as taxas de espermatozoides mortos como observado neste estudo. Entretanto, como mencionado, as variações individuais

existem, com dois dos garanhões parecendo ser mais resistentes a tal mecanismo deletério do que os demais. Um grande exemplo dessa correlação negativa encontrada foi observada no garanhão (A) utilizado em ambos os experimentos, para o qual observamos um aumento na mortalidade e uma diminuição nas células vivas ($p < 0,05$) já no T30 em ambas as concentrações (50 e 100 UI/mL). Por outro lado, se observarmos outro garanhão de baixa resposta, como o garanhão C, houve a manutenção de espermatozoides vivos ao longo do período de incubação, pelo menos até 30 min (T30), mas com um aumento significativo na mortalidade após duas horas de incubação ($p > 0,05$). Neste último caso, a correlação encontrada se torna curiosa, pois sabe-se que a heparina necessita de um período de duas horas para saturar seus ligantes no espermatozoide (PARRISH *et al.* 1986). Assim, esse fenômeno nos faz ponderar que, mesmo que aparentemente, este garanhão não tenha respondido à heparina no T30, é possível que após este período as células passassem a responder, já que em outros trabalhos na literatura utilizam tempo superiores a 2 h de incubação com heparina (LI *et al.*, 1995, ALM *et al.*, 2001; TREMOLEDA *et al.*, 2003) Desta forma, inferimos que as células que capacitaram e reagiram vieram a morrer, elevando as taxas de mortos observadas no T2. Em 2019, Leemans *et al.* sugeriram que os espermatozoides de garanhões que são altamente férteis possuem uma menor sobrevivência *in vitro*. Isto ocorre porque essas células são metabolicamente mais ativas e promovem elevadas concentrações de EROs, que por sua vez, aumentam a peroxidação lipídica das membranas e, assim, prejudicam a motilidade espermática e a integridade da membrana dos mesmo. Os mesmos autores, relatam que o mesmo não ocorre com espermatozoides de garanhões que não possuem o mesmo potencial reprodutivo. Estes dados corroboram com os de Gibb, Lambourne e Aitken (2014), que observaram os espermatozoides (sêmen fresco) de garanhões mais férteis (com maiores taxas de prenhez por ciclo), com maiores danos na membrana plasmática induzidos por EROs, na comparação com espermatozoides de garanhões com baixas taxas de prenhez por ciclo estral das éguas. Entretanto, observamos que pode haver divergências entre o nosso trabalho e o observado pelos autores acima. O garanhão A possuiu uma taxa de fertilidade e de prenhez por ciclo menor quando comparado aos

outros garanhões (B, C, D e E, os quais possuem boa fertilidade a campo; informação verbal²). Interessantemente, o garanhão A possui uma taxa de mortalidade mais elevada pós-incubação, principalmente nos primeiros 30 min, quando comparada aos outros garanhões, os quais possuem maiores taxas de espermatozoides vivos durante o período de incubação. Tais dados do garanhão A não corroboram ao observado Gibb, Lambourne e Aitken (2014) e Leemans *et al.* (2019), mas já os dados do garanhão B não diferem dos descritos pelos autores. Logo, pode-se supor que as elevadas taxas de mortalidade, supostamente causadas pelo processo de criopreservação, possam estar mascarando os resultados de resposta à indução da capacitação espermática. Examinando os dados dos dois garanhões responsivos (D e E), observamos que os espermatozoides de um destes parecem ter uma alta tolerância à incubação, pois houve resposta à indução da capacitação, com discreto aumento da mortalidade no T2, devido aparentemente à morte dos espermatozoides reagidos presentes na amostra no T30.

Os dados de indução da reação acrossômica do Experimento II mostram que os garanhões que foram responsivos à heparina também foram capazes de responder de forma significativa ao cálcio ionóforo (A23187; $p < 0,05$), de forma semelhante ao que observamos nos dados dos três touros na etapa 3 do Experimento I. Porém, não houve diferença entre as concentrações de ionóforo A23187 (0,1 e 1 μM) utilizadas, mesmo que a taxa tenha proporcionalmente se apresentado maior quando do uso da maior dose do agente indutor. O sêmen equino, sendo ele *in natura* ou congelado, responde de formas diferentes ao mesmo agente indutor da capacitação e/ou da reação acrossômica de acordo com trabalhos na literatura. Em 1993, Farlin, Jasko e Grham encontraram taxas de reação acrossômica baixas (15 a 35%) com o uso de 10 μM de cálcio ionóforo após uma incubação de 4 h. Dois anos mais tarde, Li *et al.* (1995) observaram pouca resposta do sêmen equino *in natura* frente à diversas concentrações de cálcio ionóforo A23187 (0,1, 1, 3 e 7 μM) e que o aumento das concentrações, aumentava a resposta do sêmen, chegando a variações de 5 a 63% de reação acrossômica após 6 min de incubação. Em 2001, Alm *et al.* obtiveram resposta de sêmen de equino *in natura* e congelado quando incubados com heparina (200 $\mu\text{g/mL}$) e ao cálcio ionóforo (7,4 μM de A23178) com

2. Comunicação pessoal de Médico Veterinário Frederico Lança Schmitt, proprietário da Central de Equinos Schmitt & Gonzales Ltda, em São Jerônimo, RS.

taxas de reação acrossômica de 62,6 a 64,4% para o sêmen equino fresco e de 24,5 a 31,7% para o sêmen equino congelado, respectivamente. Os dados de reação acrossômica para o sêmen congelado destes autores, diferiram dos dados que obtivemos nesse estudo, embora as concentrações e tempos tenham sido diferentes das que utilizamos. De certa forma, a diferença na resposta observada por eles corrobora com o que observamos no presente estudo devido à resposta de diferente do sêmen de cinco garanhões frente à heparina.

A viabilidade das células espermáticas dos reprodutores após a criopreservação acaba sendo um fator crítico quando se vislumbra longos tempos de incubação necessários para a FIV. Na década de 1980, Parrish *et al.* (1986) já haviam descrito que espermatozoides após o descongelamento possuíam um curto tempo de sobrevivência em cultivo em comparação a espermatozoides frescos, provindos diretamente do ejaculado. Porém, faz-se necessário um período de incubação de no mínimo quatro horas para que o pico de fecundação ocorra *in vitro* (PARRISH; SUSKO-PARRISH; FIRST, 1985). Assim, a sobrevivência espermática após o descongelamento é um importante parâmetro para a estimativa da capacidade fecundante espermática (DELL'AQUA *et al.*, 2013). Portanto, a alta mortalidade dos espermatozoides pode ser um fator crítico ou limitante para que se obtenha a fecundação *in vitro* de oócitos equinos. A resposta à indução da reação acrossômica descrita acima, por exemplo, foi e é dependente da eficiência da capacitação espermática, sendo inversamente proporcional à mortalidade. Pode-se inferir que, ao diminuir as taxas de mortalidade ao processamento, talvez pelo uso de sêmen fresco ou refrigerado, poder-se-á alcançar uma taxa de capacitação mais elevada, e por conseguinte, taxas de reação acrossômica também mais elevadas, a exemplo do que foi observado no Experimento I em bovinos. Uma maneira de se otimizar e solucionar esse processo *in vitro* nessas espécies, sob o ponto de vista prático, e em especial para a espécie equina, seria o uso de sêmen refrigerado, pois sabe-se que este possui uma maior viabilidade e fertilidade *in vitro* do que o sêmen equino criopreservado (DELL'AQUA *et al.*, 2013). Da mesma forma, o uso de oócitos sem zona para a FIV com espermatozoide com acrossoma reagido pode vir a ser um modelo temporário para a espécie, diminuindo a necessidade de alta qualificação, estrutura técnica e física necessárias para a aplicação

da ICSI em equinos. Tais aspectos poderão ser relevantes na resolução das atuais barreiras que não permitem resultados na FIV equina.

7. CONCLUSÕES

Os resultados deste estudo nos permitem concluir que:

- 1) O protocolo adaptado da espécie bovina demonstrou que a heparina e o cálcio ionóforo (A23187) foram efetivos na indução da capacitação espermática e da reação acrossômica *in vitro* do sêmen congelado equino, apesar da taxa de mortalidade espermática ser significativamente mais elevada do que em bovinos.
- 2) O sêmen caprino congelado também respondeu à heparina na indução da capacitação espermática *in vitro*, apesar de em menor escala percentual em comparação ao bovino, enquanto que o sêmen bubalino e ovino não apresentaram resposta biológica significativa.
- 3) Um fator limitante e de alta correlação biológica foi a observação de uma elevada mortalidade espermática devido ao processo de congelamento e após o período de incubação *in vitro* dos espermatozoides dos espécimes animais que também não responderam à heparina, em especial nas espécies ovina, bubalina e equina.
- 4) O uso de espermatozoides capacitados e com acrossoma reagido para a fecundação *in vitro* de oócitos bovinos maturados *in vitro* sem zona pelúcida permitiu a adesão dos gametas, a fusão das membranas, a fecundação e a ativação embrionária em padrão predominantemente monospérmico.

8. PERSPECTIVAS

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, pretende-se futuramente realizar experimentos de ajuste de protocolo de indução da capacitação, variando concentrações e tempos de incubação com a heparina nas espécies não responsivas, buscando melhoria nas taxas de capacitação espermática.

Além disso, deveremos buscar utilizar diferentes substâncias indutoras da capacitação *in vitro* e/ou até mesmo testar combinações de substâncias, como o uso de heparina em associação a proteínas de ligação aos espermatozoides bovinos (BSPs), no intuito de aumentar as respostas nas espécies que não responderam aos tratamentos com heparina. Durante o presente estudo, observamos comportamentos diferentes entre indivíduos da mesma espécie e de espécies diferentes. Assim, faz-se necessário o aumento da representatividade de cada espécie pelo aumento no número de indivíduos a serem testados.

Também deveremos buscar estabelecer estratégias que venham solucionar o problema observado quanto à elevada mortalidade do sêmen congelado nas espécies bubalina, ovina e, em especial, a equina. Estratégias como o uso de sêmen refrigerado, o qual possui uma maior sobrevida do que o sêmen congelado, passa a ser óbvia, uma vez que, já que o ideal é aumentar o tempo de incubação com a heparina, seria necessário que os espermatozoides permanecessem vivos após esse período, se houver a intenção de uso em procedimentos de FIV. Assim, uma sobrevivência por diferentes períodos se faz necessária para o procedimento de fecundação *in vitro*. Outra estratégia seria a remoção da zona pelúcida, para que o espermatozoide possa entrar em contato breve e direto com o oócito, reduzindo o tempo necessário para que o pico de fecundação venha a acontecer, o qual se preconiza ser em torno de 3 a 4 h após o início da co-incubação dos gametas. Também deve-se comprovar e transpor o efeito da *zona hardening* que parece ocorrer em equinos, pela modificação de meios de manipulação e maturação *in vitro* de oócitos, em especial com respeito às concentrações de íon cálcio. Por último, métodos alternativos de FIV, como a FIV de oócitos sem zona, ou a injeção de espermatozoide capacitado e reagido no espaço perivitelínico ou subzonal (SUZI) de oócito maturado *in vitro*, deverão facilitar a PIV de embriões equinos pela FIV via SUZI, pelo menos até a FIV convencional nesta espécie ser dominada.

Uma vez estabelecido um protocolo de FIV de forma que os reprodutores passem a responder à heparina ou a outras substâncias indutoras de capacitação, buscaremos induzir a reação acrossômica, em especial no sêmen equino e nas demais espécies, com o intuito de realizar ensaios de FIV utilizando o oócito bovino como modelo de oócito sem zona e/ou para a injeção subzonal de espermatozoide (SUZI) inter-espécie para estudos *in vitro*, para no futuro extrapolar tal conhecimento para a FIV em espécies mamíferas domésticas. Contudo, esses procedimentos, acima citados, fornecem oportunidades extraordinárias e conhecimentos acerca dos processos envolvidos na fecundação em espécies domésticas, em especial, sobre a elucidação de mecanismos relacionados à interação espermatozoide-oócito, e das proteínas e componentes associados à adesão e fusão dos gametas que conduzem a fecundação e subsequente desenvolvimento embrionário. Também urge o desvendar dos processos de reação acrossômica e moléculas envolvidas na preparação da fecundação no espermatozoide e no oócito e o papel das etapas de bloqueio da polispermia, devido a aparente surgimento de mecanismos auxiliares neste mecanismo após a fecundação.

Em seu final, estudos nesta linha visam um aumento no conhecimento dos processos biológicos envolvidos na maturação dos gametas, na fecundação e no desenvolvimento embrionário subsequente, e que deverão se repercutir em melhoria na eficiência da PIV e no desenvolvimento de protocolos de PIV pela FIV cada vez mais refinados e mais próximos do fisiológico, com o intuito de minimizar potenciais efeitos negativos da manipulação *in vitro* de gametas e embriões na vida pré e pós-natal.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, H.; SHIMODA, M.; HIRABAYASHI, M.; HOCHI, S. A combined treatment of ionomycin with ethanol improves blastocyst development of bovine oocytes harvested from stored ovaries and microinjected with spermatozoa. **Theriogenology**, v. 72, n. 4, p. 453-460, 2009.
- ADHAM, I. M.; NAYERNIA, K.; ENGEL, W. Spermatozoa lacking acrosin protein show delayed fertilization. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 46, n. 3, p. 370-376, 1997.
- AITKEN, R. Y. Free radicals, lipid peroxidation and sperm function. **Reproduction, Fertility and Development**, v.7, p.659-668, 1995.
- ALBERIO, R.; ZAKHARTCHENKO, V.; MOTLIK, J.; WOLF, E. Mammalian oocyte activation: lessons from the sperm and implications for nuclear transfer. **International journal of developmental biology**, v. 45, n. 7, p. 797-809, 2004.
- ALLEN, W. R. The development and application of the modern reproductive technologies to horse breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 40, n. 4, p. 310-329, 2005.
- ALM, H.; TORNER, H.; BLOTTNER, S.; NURNBERG, G.; KANITIZ, W. Effect of sperm cryopreservation and treatment with calcium ionophore or heparin on in vitro fertilization of horse oocytes. **Theriogenology**, v. 56, n. 5, p. 817-829, 2001.
- AMBROUSI, B.; ACCOGLI, G.; DOUET, C.; CANEPA, S.; PASCAL, G. Deleted in malignant brain tumor 1 is secreted in the oviduct and involved in the mechanism of fertilization in equine and porcine species. **Reproduction**, v. 146, p. 119-133, 2013.
- AMANN, RUPERT P. Can the fertility potential of a seminal sample be predicted accurately?. **Journal of andrology**, v. 10, n. 2, p. 89-98, 1989.
- ANAND, T.; KUMAR, D.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S.; PALTA, P. Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, n. 2, p. 253-257, 2008.
- ANIFANDIS, G.; MESSINI, C.; DAFOPOULOS, K.; SOTIRIOU, S.; MESSINIS, I. Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions opinions relative to in vitro fertilization (IVF). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 7, p. 12972-12997, 2014.
- ARCELAY, E.; SALICIONI, A. M.; WERTHEIMER, E.; VISCONTI, P. E. Identification of proteins undergoing tyrosine phosphorylation during mouse sperm capacitation. **International Journal of Developmental Biology**, v. 52, n. 5-6, p. 463-472, 2008.
- ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. A.; HAIPECK, K.; LIMA, A. S.; MELLO, M. R. B.; OLIVEIRA, L. J.; OLIVEIRA, V. P.; TAVARES, L. M. T.; VISINTIN, J. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 3, p. 149-156, 2002.
- AUSTIN, C. R. Activation and the correlation between male and female elements in fertilization. **Nature**, v. 168, n. 4274, p. 558, 1951.
- BALL, B. A.; VO, A. T.; BAUMBER, J. Generation of reactive oxygen species by equine spermatozoa. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 4, p. 508-515, 2001.

- BARCLAY, A. N.; BROWN, M.H. Heterogeneity of interactions mediated by membrane glycoproteins of lymphocytes. **Biochemical Society Transactions**, v. 25, n. 1, p. 224-227, 1997.
- BARRIGA, YESENIA C. H. **Crio-preservación y viabilidad espermática de semen de bovinos charolais post-descongelación con diferentes concentraciones de trehalosa**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- BARROS, C.; GONZALEZ, J.; HERRERA, E.; BUSTOS-OBREGON, E. Human sperm penetration into zona-free hamster oocytes as a test to evaluate the sperm fertilizing ability. **Andrologia**, v. 11, n. 3, p. 197-210, 1979.
- BEATTY, R. A. Parthenogenesis and polyploidy in mammalian development. 1957.
- BERGER, T. Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 3, p. 525-530, 1989.
- BERNARDI, M. L. Produção in vitro de embriões ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 33, n. 1, p. 1-16, 2005.
- BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**, v. 361, n. 6410, p. 315-325, 1993.
- BERTOLINI, M.; BERTOLINI, L. R. Advances in reproductive technologies in cattle: from artificial insemination to cloning. **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia**, v. 56, n. III, p. 184-194, 2009.
- BERTOZZO, B. R.; SAMPAR, B. F. B.; BRENDER, É. S. C.; PAGNOCELLI, R. R.; COSTA, E. V.; NETO ZUCCARI, C. E. S. Vantagens e desafios das biotécnicas avançadas utilizadas na reprodução equina assistida. **Boletim de Indústria Animal**, 71(1), 84-93, 2014.
- BEZARD, J. In vitro fertilization in the mare. **Rec Med Vet**, v. 168, p. 993-1003, 1992.
- BIANCHI, E.; DOE, B.; GOULDING, D.; WRIGHT, G. J. Juno is the egg Izumo receptor and is essential for mammalian fertilization. **Nature**, v. 508, n. 7497, p. 483-487, 2014a.
- BIANCHI, E.; WRIGHT, G. J. Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. **Cell Cycle**, v. 13, n. 13, p. 2019-2020, 2014b.
- BIGGERS, J. D. IVF and embryo transfer: historical origin and development. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 25, n. 2, p. 118-127, 2012.
- BLEIL, J. D.; WASSARMAN, P. M. Structure and function of the zona pellucida: identification and characterization of the proteins of the mouse oocyte's zona pellucida. **Developmental Biology**, v. 76, n. 1, p. 185-202, 1980.
- BLOBEL, C. P.; WOLFSBERG, T. G.; TURCK, C. W.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P.; WHITE, J. M. A potential fusion peptide and an integrin ligand domain in a protein active in sperm-egg fusion. **Nature**, v. 356, n. 6366, p. 248-252, 1992.
- BLONDIN, P.; BEAULIEU, M.; FOUMIER, V.; MORIN, N.; CRAWFORD, L.; MADAN, P.; KING, W. Analysis of bovine sexed sperm for IVF from sorting to the embryo. **Theriogenology**, v. 71, n. 1, p. 30-38, 2009.
- BLOTTNER, S.; NEHRING, H.; TORNER, H. Individual differences in capacitation of bull spermatozoa by heparin in vitro: relationship to fertility. **Theriogenology**, v. 34, n. 3, p. 619-628, 1990.

- BLOTTNER, S.; WARNKE, C.; TUCHSCHERER, A.; HEINEN, V.; TORNER, H. Morphological and functional changes of stallion spermatozoa after cryopreservation during breeding and non-breeding season. **Animal Reproduction Science**, v. 65, n. 1-2, p. 75-88, 2001.
- BOUCHEIX, C.; BENOIT, P.; FRACHET, P.; BILLARD, M.; WORTHINGTON, R.; GAGNON, J.; UZAN, G. Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 1, p. 117-122, 1991.
- BRACKETT, B. G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M. L.; DONAWICK, W. J.; EVANS, J. F.; DRESSEL, M. A. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.
- BRANNIGAN, R.; LIPSHULTZ, L. Sperm transport and capacitation. **Women's Medicine. The global library of Women's Medicine**, 2008.
- BREVINI, T. A. L.; GANDOLFI, F. Parthenotes as a source of embryonic stem cells. **Cell Proliferation**, v. 41, p. 20-30, 2008.
- BUFFONE, M. G. (Ed.). Sperm acrosome biogenesis and function during fertilization. 2016.
- BURNAUGH, L.; SABEUR, K.; BALL, B.A. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. **Theriogenology**, v.67, p.580-589, 2007.
- BYRD, W. In vitro capacitation and the chemically induced acrosome reaction in bovine spermatozoa. **Journal of Experimental Zoology**, v. 215, n. 1, p. 35-46, 1981.
- CAMPANHA, B. C. S. **Derivação de células- tronco embrionárias, com a utilização de inibidores MEK 1 e GSK3, a partir de embriões de camundongo ativado partenogeneticamente.** UNESP-Assis-SP. Disponível em: <<https://bv.fapesp.br/pt/bolsas/13003/derivacao-celulas-tronco-embrionarias-utilizacao/>> Acesso em 26 Marc. 2020.
- CHANG, M C. Fertilizing capacity of spermatozoa deposited into the fallopian tubes. **Nature**, v. 168, n. 4277, p. 697-698, 1951.
- CHANG, M. C. Fertilization of rabbit ova *in vitro*. **Nature**, v. 184, n. 4684, p. 466-467, 1959.
- CHAVES, R. N.; DUARTE, A. B. G.; MATOS, M. H. T.; & FIGUEIREDO, J. R. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 37-49, 2010.
- CHEN, S.A; TUNG, MS; COONROD, K.S.; BIGLER, Y.; CHANG, D.; YAMASHITA, A; KINCADE, Y.; HERR, P. W.; WHITE, J.C.Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization.**Proceedings of the National Academy of Science of the USA**, v. 96, p. 11830-11835, 1999.
- CHENG, F. P.; FAZELI, A.; VOORHOUT, W. F.; MARKS, A.; BEVERS, M. M.; COLENBRANDER, B. E. N. Use of peanut agglutinin to assess the acrosomal status and the zona pellucida-induced acrosome reaction in stallion spermatozoa. **Journal of Andrology**, v. 17, n. 6, p. 674-682, 1996.
- CHOI, Y. H.; OKADA, Y.; HOCHI, S.; BRAUN, J.; SATO, K.; OGURI, N. In vitro fertilization rate of horse oocytes with partially removed zonae. **Theriogenology**, v. 42, n. 5, p. 795-802, 1994.

- CIBELLI, J.; WILMUT, I. S.; JAENISCH, R.; GURDON, J.; LANZA, R.; WEST, M.; CAMPBELL, K. H. Principles of cloning. *In: FISSORE, R. A.; SMYTH, J.; KUROKAWA, M.; COLLAS, P. **Activation of Mammalian Oocytes***. Academic press, 2013. v. 1 p. 21-45.
- CLIFT, D.; SCHUH, M. Restarting life: fertilization and the transition from meiosis to mitosis. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 14, n. 9, p. 549-562, 2013.
- COCERO, M. J.; ALABART J. L.; HAMMAMI, S.; MARTÍ, J.I.; LAHOZ, B.; SÁNCHEZ, P.; ECHEGOYEN, E.; BECHERS, J. F.; FOLCH, J. The efficiency of in vitro ovine embryo production using an undefined or a defined maturation medium is determined by the source of the oocyte. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 46, n. 3, p. 463-470, 2011.
- COGNIE, Y.; CROZET, N.; GUERIN, Y.; POULIN, N.; BEZARD, J.; DUCHAMP, G.; MAGISTRINI, M.; PALMER, E. In vitro fertilization in sheep, goats and horses. *Ann. De Zootech*, v. 41, p. 353-359, 1992.
- COGNIE, Y.; BARIL, G.; POULIN, N.; MERMILLOD, P. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*, v. 59, n. 1, p. 171-188, 2003.
- COLLAS, P.; SULLIVAN, E. J.; BARNES, F. L. Histone H1 kinase activity in bovine oocytes following calcium stimulation. *Molecular reproduction and development*, v. 34, n. 2, p. 224-231, 1993.
- COX, J. F.; SARAVIA, F. Uso de un test de penetración espermática múltiple en ovinos. *In: Proc. XVII Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Producción Animal, Chillán, Ref. 1992*.
- COX, J. F.; SARAVIA, F.; BRIONES, M.; SANTA MARIA, A. Dose-dependent effect of heparin on fertilizing ability of goat spermatozoa. *Theriogenology*, v. 44, n. 3, p. 451-460, 1995.
- COY, P.; GARCÍA-VÁZQUEZ, F. A.; VISCONTI, P. E.; AVILÉS, M. Roles of the oviduct in mammalian fertilization. *Reproduction*, v. 144, n. 6, p. 649, 2012.
- CZLONKOWSKA, M.; EYSYMONT, U.; GUSZKIEWICZ, A.; KOSSAKOWSKI, M.; DZIAK, J. Birth of lambs after in vitro maturation, fertilization, and coculture with oviductal cells. *Molecular reproduction and development*, v. 30, n. 1, p. 34-38, 1991.
- DE FELICI, M.; SIRACUSA, G. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. *Gamete Research*, v. 6, n. 2, p. 107-113, 1982.
- DE FELICI, M.; SALUSTRI, A.; SIRACUSA, G. "Spontaneous" hardening of the zona pellucida of mouse oocytes during in vitro culture. II. The effect of follicular fluid and glycosaminoglycans. *Gamete Research*, v. 12, n. 3, p. 227-235, 1985.
- DELL'AQUILA, M. E.; FUSCO, S.; LACALANDRA, G. M.; MARITATO, F. In vitro maturation and fertilization of equine oocytes recovered during the breeding season. *Theriogenology*, v. 45, n. 3, p. 547-560, 1996.
- DELL'AQUILA, M. E.; CHO, Y.; MINOIA, P.; TRAINA, V.; FUSCO, S.; LACALANDRA, G.; MARITATO, F.; Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) versus conventional IVF on abattoir-derived and in vitro-matured equine oocytes. *Theriogenology*, v. 47, p. 1139-1156, 1997a.
- DELL'AQUILA, M. E.; CHO, Y.; MINOIA, P.; TRAINA, V.; & LACALANDRA, G. Effects of follicular fluid supplementation of *in vitro* maturation medium on the fertilization and development of equine oocytes after *in vitro* fertilization or intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, v. 12, p. 2766-2772, 1997b.

- DELL'AQUILA, M. E.; DE FELICI, M.; MASSARI, S.; MARITATO, F.; & MINOIA, P. Effects of fetuin on zona pellucida hardening and fertilizability of equine oocytes matured in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 61, n. 2, p. 533-540, 1999.
- DELL'AQUA, C.; MONTEIRO, G. A.; DELL'AQUA, JR. J. A.; PAPA, F. O. The effects of refrigeration temperature and storage time on apoptotic markers in equine semen. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 33, n. 1, p. 27-30, 2013.
- DE MACEDO, M. P.; GLANZNER, W. G.; RISSI, V. B.; GUTIERREZ, K.; CURRIN, L.; BALDASSARRE, H.; BORDIGNON, V. A fast and reliable protocol for activation of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 123, p. 22-29, 2019.
- DE REPRODUÇÃO ANIMAL, CBRA-Colégio Brasileiro. Manual para exame andrológico e avaliação seminal. **CBRA, Belo Horizonte**, 2013.
- DESMEDT, V.; CROZET, N.; AHMED-ALI, M.; SEVELLEC, C. *In vitro* maturation and fertilization of goat oocytes. **Theriogenology**, v.37, p.1049-1060, 1992.
- DOZORTSEV, D.; RYBOUCHKIN, A.; DE SUTTER, P.; QIAN, C.; DHONT, M. Fertilization and early embryology: Human oocyte activation following intracytoplasmic injection: the role of the sperm cell. **Human Reproduction**, v. 10, n. 2, p. 403-407, 1995.
- DUCIBELLA, T.; SCHULTZ, R. M.; OZIL, J. P. Role of calcium signals in early development. **In: Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2006. p. 324-332.
- ELAMARAN, G.; SINGH, K.; SINGH, M.; SINGLA, S.; CHAUHAN, M. Oxygen Concentration and Cysteamine Supplementation During *In vitro* Production of Buffalo (*Bubalus bubalis*) Embryos Affect mRNA Expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 6, p. 1027-1036, 2012.
- ESTEVEZ, S. C.; SHARMA, R. K.; THOMAS JR; A. J.; AGARWAL, A. Evaluation of acrosomal status and sperm viability in fresh and cryopreserved specimens by the use of fluorescent peanut agglutinin lectin in conjunction with hypo-osmotic swelling test. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 33, n.3, p. 364-376, 2007.
- FARIN, P. W.; CROSIER, A. E.; FARIN, C. E. Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 1, p. 151-170, 2001.
- FARLIN, M. E.; JASKO D. G.; GRHAM J. K., et al. Heparin-induced capacitation: a comparison between the bull and stallion. **Equine Veterinary Journal**, v. 25, n. S15, p. 49-52, 1993.
- FAUSER, B. C.; EDWARDS, R. G. The early days of IVF. 2005.
- FELTRIN, C.; FORELL, F.; DOS SANTOS, L.; RODRIGUES, J. L. 35 *In vitro* bovine embryo development after nuclear transfer by handmade cloning using a modified wow culture system. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 2, p. 126-126, 2006.
- FERRER-BUITRAGO, M.; BONTE, D.; DE SUTTER, P.; LEYBAERT, L.; HEINDRYCKX, B. Single Ca²⁺ transients vs oscillatory Ca²⁺ signaling for assisted oocyte activation: limitations and benefits. **Reproduction**, v. 155, n. 2, p. R105-R119, 2018.
- FIRST, N. L.; PARRISH, J. J. Sperm maturation and *in vitro* fertilization. **In: 11th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination, Belfield Campus, University College Dublin (Ireland)**, 26-30 Jun 1988. 1989.
- FOLHADELLA, Isabella de Moura. Perfil protéico do sêmen e fertilidade de touros da raça Gir. 2008.

- FUJII, Y.; YOSHIOKA, T.; SASAKI, J. Fetal calf serum increased the zona pellucida penetrability of rat oocytes matured *in vitro*. **Acta Medica Okayama**, v. 44, n. 4, p. 203-208, 1990.
- FUJIMOTO, S.; YOSHIDA, N.; FUKUI, T.; AMANI, M.; ISOBE, T.; ITAGAKI, C.; IZUMI, T.; PERRY, C. F. A. Mammalian phospholipase C ζ induces oocyte activation from the sperm perinuclear matrix. **Developmental Biology**, v. 274, n. 2, p. 370-383, 2004.
- FUNAHASHI, H. Methods for improving *in vitro* and *in vivo* boar sperm fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p. 40-47, 2015.
- FLEET, T. L.; VARNER, D. D.; BLANCHARD, T. L.; VOGELSANG, M. M.; THOMPSON, J. A. Use of heparin to accelerate capacitation of equine spermatozoa *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. monograph_series1, p. 713-718, 1995.
- GADELLA, B. M. Interaction of sperm with the zona pellucida during fertilization. **Reproduction in Domestic Ruminants VII**, p. 267, 2011.
- GALLI, C.; COLLEONI, S.; DUCHI, R.; LAGUTINA, I.; LAZZARI, G. Developmental competence of equine oocytes and embryos obtained by *in vitro* procedures ranging from *in vitro* maturation and ICSI to embryo culture, cryopreservation and somatic cell nuclear transfer. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.39-55, 2007.
- GARCÍA-MARTINÉZ, S.; LOPEZ-ALBORS, O.; LACTORRE, R.; ROMAR, R.; COOY, P. Culture under the physiological temperature registered along the reproductive tract of female pigs improves the blastocysts yield *in vitro*. **Animal Reproduction**, v.16, p.726, 2019.
- GASPARRINI, B. *In vitro* embryo production in buffalo species: state of the art. **Theriogenology**, v. 57, n. 1, p. 237-256, 2002.
- GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; MARCHANDISE, J.; DI PALO, R.; GEORGE, F.; DONNAY, I.; ZICARELLI, L. Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v. 65, n. 2, p. 275-287, 2006.
- GATENBY, L.; BONDIOLI, K. R. 112 The effect of biological extenders on *in vitro* induction of the acrosome reaction in bovine spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32, n. 2, p. 183-183, 2019.
- GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E.; Chang's meaning of capacitation: A molecular perspective. **Molecular reproduction and development**, v. 83, n. 10, p. 860-874, 2016.
- GIBB, Z.; LAMBOURNE, S. R.; AITKEN, R. J. The paradoxical relationship between stallion fertility and oxidative stress. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 3, p. 77, 1-10, 2014.
- GIL, M. A.; CUELLO, C.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J. M.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. A. Advances in swine *in vitro* embryo production technologies. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, p. 40-48, 2010.
- GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L. D.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. D. Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2002.
- GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção *in vitro* de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

- GONÇALVES, P. B. D.; DE FIGUEIREDO, J. R.; DE FIGUEIRÊDO FREITAS, V. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. Editora Roca, 2008.
- GONZALEZ-GARCIA, J. R.; MACHATY, Z.; LAI, F. A.; SWANN, K. The dynamics of PKC-induced phosphorylation triggered by Ca²⁺ oscillations in mouse eggs. **Journal of cellular physiology**, v. 228, n. 1, p. 110-119, 2013.
- GOUDET, G.; MUGNIER, S.; CALLEBAUT, I.; MONGET, P. Phylogenetic analysis and identification of pseudogenes reveal a progressive loss of zona pellucida genes during evolution of vertebrates. **Biology of reproduction**, v. 78, n. 5, p. 796-806, 2008.
- GOUDET, G.; DOUET, C.; KAABOUBA-ESCURIER, A.; COUTY, I.; MOROS-NICOLÁS, C.; BARRIÈRE, P.; BLARD, T.; REIGNER, F.; DELEUZE, S.; MAGISTRINI, M. Establishment of conditions for ovum pick up and IVM of jennies oocytes toward the setting up of efficient IVF and in vitro embryos culture procedures in donkey (*Equus asinus*). **Theriogenology**, v. 86, n. 2, p. 528-535, 2016.
- GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. CABI, 2003.
- GRAHAM, J. K. Methods for induction of capacitation and the acrosome reaction of stallion spermatozoa. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 12, n. 1, p. 111-117, 1996.
- GREEN, D. P. Three-dimensional structure of the zona-pellucida. **Reviews of Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 147-156, 1997.
- GROSS, V. S.; WESSEL, G.; FLORMAN, H.; DUCIBELLA, T. A monoclonal antibody that recognizes mammalian cortical granules and a 32-kilodalton protein in mouse eggs. **Biology of Reproduction**, v. 63, n. 2, p. 575-581, 2000.
- GRUPEN, C. G.; NOTTLE, M. B.; NAGASHIMA, H. Calcium release at fertilization: artificially mimicking the oocyte's response to sperm. **Journal of Reproduction and Development**, v. 48, n. 4, p. 313-333, 2002.
- HAMMAM, A. M.; WHISNANT, C. S.; ELIAS, A.; ZAABEL, S. M.; HEGAB, A. O.; ABU-EL-NAGA, E. M. Effect of media, sera and hormones on *in vitro* maturation and fertilization of water buffalos (*Bubalus bubalis*). **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 1, p. 27-31, 2010.
- HASLER, F. J. F.; HENDERSON, W. B.; HURTGEN, P. J.; JIN, Z. Q.; MCCAULEY, A. D.; MOWER, S. A.; NEELY, B.; SHUEY, J. S.; STOKES, J. E.; TRIMMER, S. A. Production, freezing and transfer of bovine IVF embryos and subsequent calving results. **Theriogenology**, v. 43, n. 1, p. 141-152, 1995.
- HANADA, A.; CHANG, M.C. Penetration of zona-free eggs by spermatozoa of different species. **Biology of Reproduction**, v. 6, p. 300-309, 1972.
- HANADA, A.; CHANG, M. C. Penetration of hamster and rabbit zona-free eggs by rat and mouse spermatozoa with special reference to sperm capacitation. **Reproduction**, v. 46, n. 1, p. 239-241, 1976.
- HANADA, A. *In vitro* fertilization in goats. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 31, p. 21-26, 1985.
- HANDROW, R. R.; FIRST, N. L.; PARRISH, J. J. Calcium requirement and increased association with bovine sperm during capacitation by heparin. **Journal of Experimental Zoology**, v. 252, n. 2, p. 174-182, 1989.

- HARRISON, R. A. P. Rapid PKA-catalysed phosphorylation of boar sperm proteins induced by the capacitating agent bicarbonate. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 67, n. 3, p. 337-352, 2004.
- HARRISON, R. AP; GADELLA, B. M. Bicarbonate-induced membrane processing in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 63, n. 2, p. 342-351, 2005.
- HARTWIG, F. P.; LISBOA, F. P.; MONTEIRO, G. A.; MAZIERO, R. R. D.; FREITAS-DELL'AQUA, C. P.; ALVARENGA, M. A.; PAPA, F. O.; DELL'AQUA JR, J. A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: An alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v. 81, n. 2, p. 340-346, 2014.
- HERMO, L.; PELLETIER, R. M.; CYR, D. G.; & SMITH, C. E. Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 1: background to spermatogenesis, spermatogonia, and spermatocytes. **Microscopy Research and Technique**, v. 73, n. 4, p. 241-278, 2010.
- HINRICHS, K.; LOVE, C. C.; BRINSKO, S. P.; CHOI, Y. H.; VARNER, D. D. *In vitro* fertilization of *in vitro*-matured equine oocytes: effect of maturation medium, duration of maturation, and sperm calcium ionophore treatment, and comparison with rates of fertilization *in vivo* after oviductal transfer. **Biology of Reproduction** v. 67, p. 256–262, feb., 2002.
- HINRICHS, K. Assisted reproductive techniques in mares. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 53, p. 4-13, 2018.
- HIPP, J.; ATALA, A. Tissue engineering, stem cells, cloning, and parthenogenesis: new paradigms for therapy. **Journal of experimental & clinical assisted reproduction**, v. 1, n. 1, p. 3, 2004.
- HIROSE, M.; OGURA, A. The golden (Syrian) hamster as a model for the study of reproductive biology: Past, present, and future. **Reproductive medicine and biology**, v. 18, n. 1, p. 34-39, 2019.
- HOLM, P.; BOOTH, P. J.; SCHMIDT, M. H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**, v. 52, n. 4, p. 683-700, 1999.
- HOODBHOY, T.; TALBOT, P. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, n. 4, p. 439-448, 1994.
- HORI, N. Aberrant CpG methylation of the imprinting control region KvDMR1 detected in assisted reproductive technology-produced calves and pathogenesis of large offspring syndrome. **Animal Reproduction Science**, v. 122, n. 3-4, p. 303-312, 2010.
- HORVATH, P.; KELLOM, T.; CAULFIELD, J.; BOLDT, J. Mechanistic studies of the plasma membrane block to polyspermy in mouse eggs. **Molecular Reproduction and Development**, v. 34, n. 1, p. 65-72, 1993.
- HUANG, Y.; ZHANG, X.; GASPARRINI, B.; PRESICCE, G. A. 245 Oocyte recovery by ovum pick up and embryo production in murrh and nili-ravi buffaloes (*bubalus bubalis*) imported in china. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 17, n. 2, p. 273-273, 2004.
- HUFANA-DURAN, D.; PEDRO, P. B.; VENTURINA, H. V.; HUFANA, R. D.; SALAZAR, A. L.; DURAN, P. G.; CRUZ, L. C. Post-warming hatching and birth of live calves following transfer of *in vitro* derived vitrified water buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1429-1439, 2004.

- HUGHES, D. C.; BARRATT, C. L. R. Identification of the true human orthologue of the mouse Zp1 gene: evidence for greater complexity in the mammalian zona pellucida?. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression**, v. 1447, n. 2-3, p. 303-306, 1999.
- HUGENTOBLER, S.; MORRIS, D. G.; KANE, M. T.; SREENAN, J. M. *In situ* oviduct and uterine pH in cattle. **Theriogenology**, v. 61, n. 7-8, p. 1419-1427, 2004.
- INOUE, N.; IKAWA, M.; ISOTANI, A.; OKABE, M. The immunoglobulin superfamily protein Izumo is required for sperm to fuse with eggs. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 234-238, 2005.
- IRITANI, A. Micromanipulation of gametes for *in vitro* assisted fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, p. 199-207, 1991.
- IZQUIERDO, D.; VILLAMEDIANA, P.; PARAMIO, M. T. Effect of culture media on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. **Theriogenology**, v. 52, n. 5, p. 847-861, 1999.
- IZQUIERDO-RICO, M. J.; IZQUIERDO R.; MOVILLA, M. J.; LLOP, E.; PÉREZ, A. B.; BALLESTA, J.; GALLEGO, R. G.; CERVANTES, J. C.; AVILÉS, M. Hamster zona pellucida is formed by four glycoproteins: ZP1, ZP2, ZP3, and ZP4. **Journal of proteome research**, v. 8, n. 2, p. 926-941, 2009.
- JONES, J. L.; WALKER, R. A. Integrins: a role as cell signalling molecules. **Molecular Pathology**, v. 52, n. 4, p. 208, 1999.
- KADIRVEL, G.; KATHIRAVAN, P.; KUMAR, S. Protein tyrosine phosphorylation and zona binding ability of *in vitro* capacitated and cryopreserved buffalo spermatozoa. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1630-1639, 2011.
- KIM, S.; AGCA, C.; AGCA, Y. Effects of various physical stress factors on mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 7, p. 1051-1064, 2013.
- KOTHARI, S.; THOMPSON, A.; AGARWAL, A.; PLESSES, S.S. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm functions. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.48, p.425-435, 2010.
- KOVACS, A.; FOOTE, R.H. Viability and acrosome staining of bull, boar and rabbit sperm. **Biotechnic. Histochemistry**, v. 67, p. 119-124, 1992.
- KUMAR, S.; KHAN, S.; SIVAKUMAR, A.; YATHISH, H. M.; SIVAMANI, B.; SHARMA, D.; SHARMA, A. Zona free hamster oocyte penetration test: a reliable *in vitro* bioassay to assess the bull fertility. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, p. 102-106, 2013.
- KURASAWA, S.; SCHULTZ, R. M.; KOPF, G. S. Egg-induced modifications of the zona pellucida of mouse eggs: effects of microinjected inositol 1, 4, 5-trisphosphate. **Developmental Biology**, v. 133, n. 1, p. 295-304, 1989.
- KÜPKER, W.; DIEDRICH, K.; EDWARDS, R. G. Principles of mammalian fertilization. **Human reproduction**, v. 13, n. suppl_1, p. 20-32, 1998.
- KRAPF, D.; ARCELAY, E.; WERTHEIMER, E. V.; SANJAY, A.; PILDER, S. H.; SALICIONI, A. M.; VISCONTI, P. E. Inhibition of Ser/Thr phosphatases induces capacitation-associated signaling in the presence of Src kinase inhibitors. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 11, p. 7977-7985, 2010.

- KRISHER, R. L.; PETTERS, R. M.; JOHNSON, B. H. Effect of oviductal condition on the development of one-cell porcine embryos in mouse or rat oviducts maintained in organ culture. **Theriogenology**, v.32, n.6, p.885-92, 1989.
- LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.48-54, 1997.
- LANGE-CONSIGLIO, A.; CREMONESI, F. Hyperactivation of stallion sperm in follicular fluid for in vitro fertilization of equine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 24, n. 1, p. 193-194, 2011.
- LANDIM-ALVARENGA, F. C.; ALVARENGA, M. A.; SEIDEL JR, G. E.; SQUIRES, E. L.; GRAHAM, J. K. Penetration of zona-free hamster, bovine and equine oocytes by stallion and bull spermatozoa pretreated with equine follicular fluid, dilauroylphosphatidylcholine or calcium ionophore A23187. **Theriogenology**, v. 56, p. 937-953, 2001.
- LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A.; HERAS, S.; SMITS, K.; FERRER-BUITRAGO, M.; CLAES, E.; HEINDRYCKX, B.; DE VOS, W. H.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Procaine induces cytokinesis in horse oocytes via a pH-dependent mechanism. **Biology of Reproduction**, v. 93, n. 1, p. 23, 1-17, 2015.
- LEEMANS, B.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A.; DE SCHAUWER, C.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A. Why doesn't conventional IVF work in the horse? The equine oviduct as a microenvironment for capacitation/fertilization. **Reproduction**, v. 152, n. 6, p. R233-R245, 2016.
- LEEMANS, B.; STOUT, T. A.; DE SCHAUWER, C.; HERAS, S.; NELIS, H.; HOOGEWIJS, M.; VAN SOOM, A.; GADELLA, B. M. Update on mammalian sperm capacitation: how much does the horse differ from other species?. **Reproduction**, v. 1, n. aop, 2019.
- LEESE, H. J. The formation and function of oviduct fluid. **Reproduction**, v. 82, n. 2, p. 843-856, 1988.
- LEMAN, A. D.; DZIUK, P. J. Fertilization and development of pig follicular oocytes. **Reproduction**, v. 26, n. 3, p. 387-389, 1971.
- LI, L. Y.; MEINTJES, M.; GRAFF, K. J.; PAUL, J. B.; DENNISTON, R. S.; GODKE, R. A. *In vitro* fertilization and development of in vitro-matured oocytes aspirated from pregnant mares. **Biology of Reproduction**, v. 52, n. monograph_series1, p. 309-317, 1995.
- LIU, L.; TRIMARCHI, J. R.; KEEFE, D. L. Haploidy but not parthenogenetic activation leads to increased incidence of apoptosis in mouse embryos. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 1, p. 204-210, 2002.
- LIMA, G. L.; DOS SANTOS, É. A. A. Accomplishment of the biotechniques embryo transfer and in vitro fertilization on caprine reproduction. **Acta Veeritaria Brasileira**, 2010.
- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of oocytes in vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, p. 255-268, 2016.
- LU, K. H.; GORDON, I.; GALLAGHER, M.; McGOVEM, H. Pregnancy established in cattle by transfer of embryo derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured in vitro. **Veterinary Records**, v. 121, n. 11, p. 259-260, sept. 1987.
- LUCIO, C. D. F.; REGAZZI, F. M.; SILVA, L. C. G.; ANGRIMANI, D. D. S. R.; NICHI, M.; VANNUCCHI, C. I. Oxidative stress at different stages of two-step semen cryopreservation procedures in dogs. **Theriogenology**, v. 85, n. 9, p. 1568-1575, 2016.

- MACHADO, G. M.; CARVALLIO, J.; SIQUEIRA FILLIO, E.; CAIXETA, E.; FRANCO, M.; RUMPF, R.; DODE, M. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on *in vitro* production and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 71, n. 8, p. 1289-1297, 2009.
- MADAN, M. L.; SINGLA, S. K.; JAIKHANI, S.; AMBROSE, J. D. *In vitro* fertilization in buffalo and birth of first ever IVF buffalo calf. **In: Proceedings of the 3rd World Buffalo Congress, Varna**. p. 11-17. 1991
- MAHMOUD, A. I.; PARRISH, J. J. Oviduct fluid and heparin induce similar surface changes in bovine sperm during capacitation: a flow cytometric study using lectins. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 43, n. 4, p. 554-560, 1996.
- MANJUNATH, P.; THÉRIEN, I. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 53, n. 1-2, p. 109-119, 2002.
- MANN, J. R. Full term development of mouse eggs fertilized by a spermatozoon microinjected under the zona pellucida. **Biology of Reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1077-1083, 1988.
- MARTINS, C. F. Atlas de morfologia espermática bovina. Livros, 2016.
- MINAMI, N.; KATO, H.; INOUE, Y.; YAMADA, M.; UTSUMI, K.; IRITANI, A. Nonspecies-specific effects of mouse oviducts on the development of bovine IVM/IVF embryos by a serum free co-culture. **Theriogenology**, v.41, n.7, p.1435-45, 1994.
- McCLURE, R. D.; NUNES, L.; TOM, R. Semen manipulation: improved sperm recovery and function with a two-layer Percoll gradient. **Fertility and Sterility**, v. 51, n. 5, p. 874-877, 1989.
- McEVOY, T. G. Manipulation of domestic animal embryos and implications for development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38, n. 4, p. 268-275, 2003.
- McLAREN, A.; BIGGERS, J. D. Successful development and birth of mice cultivated *in vitro* as early embryos. **Nature**, v.182, n.4639, p.877-8, 1958
- McPARTLIN, L. A.; SUAREZ, S. S.; CZAYA, C. A.; HINRICHS, K.; BEDFORD- GUAUS, S. J. Hyperactivation of stallion sperm is required for successful *in vitro* fertilization of equine oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 199-206, 2009.
- MEDEIROS, C. M. O.; PARRISH, J. J. Changes in lectin binding to bovine sperm during heparina-induced capacitation. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 44, n. 4, p. 525-532, 1996.
- MELLO, R. R. C.; FERREIRA, J. E.; SOUSA, S. L. G. D.; MELLO, M. R. B. D.; PALHANO, H. B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 6458-6458, 2016.
- MENCHACA, A.; BARRERA, N.; DOS SANTOS NETO, P. C.; CUADRO, F.; CRISPO, M. Advances and limitations of *in vitro* embryo production in sheep and goats. **Animal Reproduction (AR)**, v. 13, n. 3, p. 273-278, 2016.
- MÉO, S. C. **Ativação partenogenética e desenvolvimento embrionário inicial de oócitos bovinos tratados com estrôncio, ionomicina e 6-dimetilaminopurina. 2002.** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista (UNESP). Campus de Jaboticabal. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

- MÉO, S. C.; YAMAZAKI, W.; FERREIRA, C. R.; PERECIN, F.; SARAIVA, N. Z.; LEAL, C. L. V.; GARCIA, J. M. Parthenogenetic activation of bovine oocytes using single and combined strontium, ionomycin and 6-dimethylaminopurine treatments. **Zygote**, v. 15, n. 4, p. 295-306, 2007.
- MINTZ, B. Experimental study of the developing mammalian egg: removal of the zona pellucida. **Science**, v. 138, n. 3540, p. 594-595, 1962.
- MISHRA, V.; MISRA, A. K.; SHARMA, R. A. comparative study of parthenogenic activation and in vitro fertilization of bubaline oocytes. **Animal reproduction science**, v. 103, n. 3-4, p. 249-259, 2008.
- MONTANARI, T. Embriologia: texto, atlas e roteiro de aulas práticas. Porto Alegre, Ed. da autora, 2013.
- MOORE, H.D.M.; AKHONDI, M.A. *In vitro* maturation of mammalian spermatozoa. **Reviews of Reproduction**, v. 1, p. 54-60, 1996.
- MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. Embriologia Clínica. **Elsevier Brasil**, 2008.
- MRAZEK, M.; FULKA J.R. Failure of oocyte maturation: possible mechanisms for oocyte maturation arrest. **Human Reproduction**, v. 18, n. 11, p. 2249-2252, 2003.
- MUGNIER, S.; KERVELLA, M.; DOUET, C.; CANEPA, S.; PASCAL, G.; DELEUZE, S.; Duchamp, G.; MongeT, P.; Goudet, G. The secretions of oviduct epithelial cells increase the equine *in vitro* fertilization rate: are osteopontin, atrial natriuretic peptide A and oviductin involved? **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 7, p. 129, 2009a.
- MUGNIER, S.; DELL'AQUILA, M. E.; PELAEZ, J.; DOUET, C.; AMBRUOSI, B.; DE SANTIS, T.; LACALANDRA, G. M.; LEBOS, C.; SIZARET, P. Y.; DELALEU, B.; MONGET, P.; MERMILLOD, P.; MAGISTRINI, M.; MEYERS, A.; GOUDET, G. New insights into the mechanisms of fertilization: comparison of the fertilization steps, composition, and structure of the zona pellucida between horses and pigs. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 5, p. 856-870, 2009b.
- NAGASHIMA, J. B.; SYLVESTER, S. R.; NELSON, J. L.; CHEONG, S. H.; MUKAI, C.; LAMBO, C.; FLANDERS, J. A.; MEYERS-WALLEN, V. N.; SONGSASEN, N.; TRAVIS, A. J. Live births from domestic dog (*Canis familiaris*) embryos produced by *in vitro* fertilization. **PloS One**, v. 10, n. 12, 2015.
- NEGLIA, G.; GASPARRINI B.; CARACCILO DI BRIENZA V.; DI PALO R.; ZICARELLI L. First pregnancies to term after transfer of buffalo vitrified embryos entirely produced in vitro. **Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie (Italy)**, 2003.
- NOGUEIRA, B. G.; SAMPAIO, B. F. B.; BENDER, E. S. C.; COSTA E SILVA, E. V.; ZÚCCARI, C. E. S. N. Peroxidação lipídica e agentes antioxidantes no sêmen de mamíferos. **REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria**, v. 15, n. 1, p. 1-15, 2014.
- OBA, E.; CAMARGOS, A. S. Produção in vitro de embriões bubalinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 80-87, 2011.
- OKABE, M.; YAGASAKI, M.; ODA, H.; MATZNO, S.; KOHAMA, Y.; MIMURA, T. Effect of a monoclonal anti-mouse sperm antibody (OBF13) on the interaction of mouse sperm with zona-free mouse and hamster eggs. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 13, n. 3, p. 211-219, 1988.
- OHASHI, O. M.; NOGUEIRA, N.; CORDEIRO FILHO, S.; TR, F. H.; RIBEIRO, L.; GUIMARÃES, T. V. Produção in vitro de embrião (PIVE) na espécie bubalina. **Revista**

- Brasileira de Reprodução Animal**, v. 14, n. 1, p. 195-200, 2017.
- OLIVARES, C. C. S.; ALFRADIQUE, V. A. P.; SOUZA FABJAN, J. M. G.; FONSECA, J. F.; SARAIVA, H. F. R. A.; CÔRTEZ, L. R.; BRANDÃO, F. Z. Influence of mini-Percoll techniques in sperm capacitation and plasma membrane integrity of ram frozen-thawed sperm. In: Embrapa Caprinos e Ovinos-Resumo em anais de congresso (ALICE). **Animal Reproduction**, v. 13, n. 3, p. 552, Jul./Sept. 2016., 2016.
- OLIVARES, C. C. S.; SOUZA FABJAN, J. M. G.; FONSECA, J. F.; CÔRTEZ, L. R.; ALFRADIQUE, V. A. P.; BRANDÃO, F. Z. Mini-percoll gradient may be used for frozen-thawed sperm selection in sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 71, n. 2, p. 455-463, 2019.
- PAFFONI, A.; BREVINI, T. A. L.; GANDOLFI, F.; RAGNI, G. Parthenogenetic activation: biology and applications in the ART laboratory. **Placenta**, v. 29, p. 121-125, 2008.
- PALMER, E.; BEZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G. *In vitro* fertilization in the horse. A retrospective study. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, v. 44, p. 375-384, 1991.
- PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, S.. Recent advances *in vitro* embryo production in small ruminants. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 152-159, 2016.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; FIRST, N. L. Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm *in vitro*. **Theriogenology**, v. 24, n. 5, p. 537-549, 1985.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE M. L.; CRITSER E. S.; EYESTONE W. H.; FIRST N. L. Bovine *in vitro* fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, v. 25, n. 4, p. 591-600, 1986.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, M. W.; FIRST, N. L. Capacitation of Bovine Sperm by Heparin1. **Biology of Reproduction**, v. 38, p. 1171-1180, 1988.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; HANDROW, R.; SIMS, M. M.; FIRST, N. L. Capacitation of bovine spermatozoa by oviduct fluid. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 5, p. 1020-1025, 1989.
- PARRISH, J. J.; SUSKO-PARRISH, J. L.; GRAHAM, J. K. *In vitro* capacitation of bovine spermatozoa: role of intracellular calcium. **Theriogenology**, v. 51, n. 2, p. 461-472, 1999.
- PARRISH, J. J. Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67-73, 2014.
- PAVLOK, A. Interspecies interaction of zona-free ova with spermatozoa in mouse, rat and hamster. **Animal Reproduction Science**, v. 2, n. 4, p. 395-402, 1979.
- PÉREZ, L. J.; VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M. A.; MOSES, D. F.; BALDASSARRE, H. *In vitro* capacitation and induction of acrosomal exocytosis in ram spermatozoa as assessed by the chlortetracycline assay. **Theriogenology**, v. 45, n. 5, p. 1037-1046, 1996.
- PENARIOL, L. B. C.. **Influência dos métodos de seleção espermática (swim-up, gradiente de Percoll® e washing), na Fertilização in vitro, associado a dinâmica do desenvolvimento embrionário em bovinos**. 2017.
- PERECIN, F.; MÉO, S. C.; LEAL, C. L. V.; GARCIA, J. M. Oocyte activation and preimplantation development of bovine embryos obtained by specific inhibition of cyclin-

- dependent kinases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 2, p. 280-287, 2007.
- PINCUS, G.; ENZMANN, E.V. Can mammalian eggs undergo normal development *in vitro*? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 20, n. 2, p. 121-122, 1934.
- QUEIROZ, V. S. **Estudo do efeito das condições de manipulação do sêmen de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758) sobre a capacitação e a integridade morfológica e funcional dos espermatozoides. 2003.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- RAMBO, Gissele. **Avaliação da dimetilacetamida e do glicerol na criopreservação do sêmen de suínos através de testes de fertilização in vitro.** 2008. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pelotas.
- RASCADO, T. S.; MARTINS, L. R.; MINTO, B. W.; LORENA, S. E. R.; LANDIM-ALVARENGA, F. C. Parthenogenetic development of domestic cat oocytes treated with ionomycin, cycloheximide, roscovitine and strontium. **Theriogenology**, v. 74, n. 4, p. 596-601, 2010.
- RIBEIRO-PERES, A.; MUNITA-BARBOSA, L.; YUMI-KANAZAWA, M.; MELLO-MARTINS, M. I.; FERREIRA DE SOUZA, F. Cryopreservation of bovine spermatozoa from the epididymal tail using conventional and automated methods. **Archivos de Medicina Veterinária**, p. 31-38, 2014
- ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; FELICIANO, M. A. R.; VICENTE, W. R. R.; OLIVEIRA, M. E. F. *In vitro* production of sheep embryos: advances and challenges. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 2, p. 103-109, 2014.
- RODRIGUES, J. L.; BERTOLINI, M. Biotecnologias da reprodução animal: de Aristóteles à edição gênica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** v. 43, n. 2, p. 204-208, 2019.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Role of the oviduct in sperm capacitation. **Theriogenology**, v. 68, p. S138-S146, 2007.
- ROGERS, B. J. Mammalian sperm capacitation and fertilization in vitro: a critique of methodology. **Gamete Research**, v. 1, n. 2, p. 165-223, 1978.
- ROBAIRE, B.; HINTON, B. T. Chapter 17-The Epididymis. Knobil and Neills Physiology of Reproduction, p. 691-771, 2015.
- ROASA, L. M.; CHOI, Y. H.; LOVE, C. C.; ROMO, S.; VARNER, D. D.; HINRICH, K. Ejaculate and type of freezing extender affect rates of fertilization of horse oocytes in vitro. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 560-566, 2007.
- RUBINSTEIN, E. CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. **European Journal Immunology**, v. 26, p. 2657, 1996.
- SAALU, L. C. The incriminating role of reactive oxygen species in idiopathic male infertility: an evidence based evaluation. **Pakistan journal of biological sciences**, v. 13, n. 9, p. 413, 2010.
- SÁ FILHO M. F.; CARVALHO N. A.; GIMENES L. U.; TORRES-JUNIOR J. R.; FERRIERA C. R.; PERECIN F.; PERINI A. P.; TETZNER T. A.; VANTINI R.; SORIA G. F.; GARCIA J. M.; TONHATI H.; ZICARELLI L.; GASPARRINI B.; BARUSELLI P. S. Birth of the first buffaloes calves after transfer of vitrified embryos produced in vitro in America. 2005.
- SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. Current therapy in equine reproduction. **Saunders Elsevier**, 2007.

- SANTANA, P. B. **A influência do sistema nitrérgico no cultivo *in vitro* de embriões bovinos.** 2012. Dissertação (mestrado) - Programa de pós-graduação em Neurociência e Biologia Celular, universidade federal do Pará, 2012.
- SANSIÑENA, M.; GASPARRINI, B.. Producción in vitro de embriones en el búfalo. 2016.
- SATOUH, Y.; INOUE, N.; IKAWA, M.; OKABE, M. Visualization of the moment of mouse sperm–egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. **Journal of cell science**, v. 125, n. 21, p. 4985-4990, 2012.
- SCHROEDER, A. C.; SCHULTZ, R. M.; KOPF, G. S.; TAYLOR, F. R.; BECKER, R. B.; EPPIG, J. J. Fetuin inhibits zona pellucida hardening and conversion of zp2 to zp3 during spontaneous mouse oocyte maturation *in vitro* in the absence of serum. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 5, p. 891-897, 1990.
- SENGER, P. L. Pathways to pregnancy and parturition. ed. Current Conceptions, Redmond, OR, 2012.
- SESSIONS-BRESNAHAN, D. R.; GRAHAM, J. K.; CARNEVALE, E. M. Validation of a heterologous fertilization assay and comparison of fertilization rates of equine oocytes using in vitro fertilization, perivitelline, and intracytoplasmic sperm injections. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 274-282, 2014.
- SHARIF, H.; VERGOS, E.; LONERGAN, P.; GALLAGHER, M.; KINIS, A.; GORDON, I. Development of early bovine embryos in the isolated mouse oviduct maintained in organ culture. **Theriogenology**, v.35, n.1, p.270, 1991. (abstr.)
- SHEN P. C.; LEE S. N.; LIU B. T.; CHU F. H.; WANG C. H.; WU J. S.; LIN H. H.; CHENG W. T. The effect of activation treatments on the development of reconstructed bovine oocytes. **Animal reproduction science**, v. 106, n. 1-2, p. 1-12, 2008.
- SHIRAZI, A.; ARDALI, M. A.; AHMADI, E.; NAZARI, H.; MAMUEE, M.; HEIDARI, B. The effect of macromolecule source and type of media during in vitro maturation of sheep oocytes on subsequent embryo development. **Journal of Reproduction & Infertility**, v. 13, n. 1, p. 13, 2012.
- SINGH, R. P.; SHAH, R. G.; TANK, P. H. Influence of different quality of buffalo oocytes on in-vitro maturation and fertilization. **Indian Journal of Animal Reproduction**, v. 33, n. 1, p. 9-13, 2012.
- SJUNNESSON, Y. *In vitro* fertilisation in domestic mammals—a brief overview. **Upsala Journal of Medical Sciences**, p. 1-9, 2019.
- SPINDLER, R. E.; HUANG, Y.; HOWARD, J. G.; WANG, P.; ZHANG, H.; ZHANG, G.; WILDT, D. E. Acrosomal integrity and capacitation are not influenced by sperm cryopreservation in the giant panda. **Reproduction**, v. 127, n. 5, p. 547-556, 2004.
- SOUZA, N. S.; ABADE, C. C. Produção in vitro de embriões bovinos: etapas de produção e histórico no Brasil. **Ciência Veterinária UniFil**, v. 1, n. 3, p. 95-108, 2019.
- SQUIRES, E. L.; SQUIRES, E. L.; Carnevale, E. M.; McCue, P. M.; Bruemmer, J. E. Embryo technologies in the horse. **Theriogenology**, v. 59, n. 1, p. 151-170, 2003.
- STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the reimplantation of human embryo. **Lancet**, v.2, n. 8085, n.366, 1978.
- STEWART-SAVAGE, J.; BAVISTER, B. D. Time course and pattern of cortical granule breakdown in hamster eggs after sperm fusion. **Molecular Reproduction and Development**,

- v. 30, n. 4, p. 390-395, 1991.
- SUAREZ, S. S.; PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 1, p. 23-37, 2006.
- SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L.; NORTHEY, D. L.; SCHUTZKUS, V.; FIRST, N. L. Inhibition of protein kinases after an induced calcium transient causes transition of bovine oocytes to embryonic cycles without meiotic completion. **Developmental biology**, v. 166, n. 2, p. 729-739, 1994.
- SUZUKI, H.; SAITO, Y.; KAGAWA, N.; YANG, X. *In vitro* fertilization and polyspermy in the pig: factors affecting fertilization rates and cytoskeletal reorganization of the oocyte. **Microscopy research and technique**, v. 61, n. 4, p. 327-334, 2003.
- TAHARA, M. A. S. A. H. I. R. O.; TASAKA, K. E. I. I. C. H. I.; MASUMOTO, N. O. B. U. Y. U. K. I.; MAMMOTO, A. K. I. K. O.; IKEBUCHI, Y. O. S. H. I. H. I. D. E.; MIYAKE, A. K. I. R. A. Dynamics of cortical granule exocytosis at fertilization in living mouse eggs. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 270, n. 5, p. C1354-C1361, 1996.
- THOMPSON, J. G. *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos—a decade of achievement. **Animal Reproduction Science**, v. 60, p. 263-275, 2000.
- THOMPSON, J. G. Lamb birth weight is affected by culture system utilized during *in vitro* pre-elongation development of ovine embryos. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1385-1391, 1995.
- TISCHNER, M. Evaluation of deep-frozen semen in stallions. **Journal of Reproduction and Fertility**. Supplement, n. 27, p. 53-59, 1979.
- TOYODA, Y.; CHANG, M. C. Sperm penetration of rat eggs *in vitro* after dissolution of zona pellucida by chymotrypsin. **Nature**, v. 220, n. 5167, p. 589-591, 1968.
- TREMOLEDA, J. L.; GADELLA, B. M.; STOUT, T. A. E.; COLENBRANDER, B.; BEVERS, M. M. Evaluation of sperm-oocyte interaction during *in vitro* fertilization in the horse. **In vitro Production of Horse Embryos: Fundamental Aspects**, p. 67-91, 2003.
- TRIANA, L. R.; BABCOCK, D. F.; LORTON, S. P.; FIRST, N. L.; LARDY, H. A. Release of acrosomal hyaluronidase follows increased membrane permeability to calcium in the presumptive capacitation sequence for spermatozoa of the bovine and other mammalian species. **Biology of reproduction**, v. 23, n. 1, p. 47-59, 1980.
- URANGA, J. A.; ARÉCHAGA, J. Cell proliferation is reduced in parthenogenetic mouse embryos at the blastocyst stage: a quantitative study. **The Anatomical Record: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, v. 247, n. 2, p. 243-247, 1997.
- VAJTA, G.; PEURA, T. T.; HOLM, P.; PALDI, A.; GREVE, T.; TROUNSON, A. O.; CALLESEN, H. L. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: The Well of the Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 55, n. 3, p. 256-264, 2000.
- VAJTA, G.; RIENZI, L.; BAVISTER, B. D. Zona-free embryo culture: is it a viable option to improve pregnancy rates?. **Reproductive biomedicine online**, v. 21, n. 1, p. 17-25, 2010.
- VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies reativas ao oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, n.1, p.47-53, 2007.

- VAN DE VELDE, A.; LIU, L.; BOLS, P. E.; YSEBAERT, M. T.; & YANG, X. Cell allocation and chromosomal complement of parthenogenetic and IVF bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 54, n. 1, p. 57-62, 1999.
- VARGA, E.; PATAKI, R.; LÓRINCZ, Z.; KOLTAI, J.; PAPP, Á. B. Parthenogenetic development of in vitro matured porcine oocytes treated with chemical agents. **Animal reproduction science**, v. 105, n. 3-4, p. 226-233, 2008.
- VELÁSQUEZ, A. E.; MANRÍQUEZ, J. R.; CASTRO, F. O.; RODRÍGUEZ-ALVAREZ, L. Effect of zona pellucida removal on early development of in vitro produced bovine embryos. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 45, n. 1, p. 7-15, 2013.
- VIANA, J. Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 36, p. 8-25, 2017.
- VISCONTI, P.E.; KOPF, G.S. Regulation of protein phosphorylation during sperm capacitation. **Biology of Reproduction**, v. 59, p. 1-6, 1998.
- VISCONTI, P. E.; KRAPF, D.; DE LA VEGA-BELTRÁN, J. L.; ACEVEDO, J. J.; DARSZON, A. Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. **Asian Journal of Andrology**, v. 13, n. 3, p. 395, 2011.
- WANG, W. H.; ABEYDEERA, L. R.; PRATHER, R. S.; DAY, B. N. Morphologic comparison of ovulated and *in vitro*-matured porcine oocytes, with particular reference to polyspermy after in vitro fertilization. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 49, n. 3, p. 308-316, 1998.
- WANG, Z. G.; WANG, W.; YU, S. D.; XU, Z. R. Effects of different activation protocols on preimplantation development, apoptosis and ploidy of bovine parthenogenetic embryos. **Animal reproduction science**, v. 105, n. 3-4, p. 292-301, 2008.
- WATSON, P F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 481-492, 2000.
- WHITFIELD, C. H.; PARKINSON, T. J. Assessment of the fertilizing potential of frozen bovine spermatozoa by in vitro induction of acrosome reactions with calcium ionophore (A23187). **Theriogenology**, v. 44, n. 3, p. 413-422, 1995.
- WHITTINGHAM, D.G. Fertilization of mouse eggs in vitro. **Nature**, v. 220, n. 5167, p. 592-593, 1968.
- YANAGIMACHI, R.; CHANG, M. C. Fertilization of hamster eggs *in vitro*. **Nature**, v. 200, n. 4903, p. 281-282, 1963.
- YANAGIMACHI, R. Penetration of guinea-pig spermatozoa into hamster eggs *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 28, n. 3, p. 477-480, 1972.
- YANAGIMACHI, R.; YANAGIMACHI, H.; ROGERS, B. J. The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 15, p. 471-476, 1976.
- YANAGIMACHI, R. Mechanisms of fertilization in mammals. **In: Fertilization and Embryonic Development in vitro**. Springer, Boston, MA, p. 81-182, 1981.
- YANAGIMACHI, R. Zona-free hamster eggs: Their use in assessing fertilizing capacity and examining chromosomes of human spermatozoa. **Gamete research**, v. 10, n. 2, p. 187-232, 1984.

- YANAGIMACHI, R. Mammalian fertilization. **In: The Physiology of Reproduction, 3rd Ed.** New York. Raven Press, p. 1989-318, 1994.
- YONEZAWA, N. Posttranslational modifications of zona pellucida proteins. **In: Posttranslational Protein Modifications in the Reproductive System.** Springer, New York, NY, 2014. p. 111-140.
- YOUNIS, A. I.; ZUELKE, K.; HARPER, K.; OLIVEIRA, M. L.; & BRACKETT, B. *In vitro* fertilization of goat oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 44, n. 6, p. 1177-1182, 1991.
- ZHANG, X.; RUTLEDGE, J.; ARMSTRONG, D. T. Studies on zona hardening in rat oocytes that are matured *in vitro* in a serum-free medium. **Molecular Reproduction and Development**, v. 28, n. 3, p. 292-296, 1991.
- ZHOU, C.; WANG, X.; CHAN, H. Bicarbonate secretion by the female reproductive tract and its impact on sperm fertilizing capacity. **Acta Physiologica Sinica-Chinese Edition**, v. 57, n. 2, p. 115, 2005.
- ZIYYAT, A.; RUBINSTEIN, E.; MONIER-GAVELLE, F.; BARRAUD, V.; KULSKI, O.; PRENANT, M.; BOUCHEIX, C.; BOMSEL, M.; WOLF, J. P. CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin $\alpha 6 \beta 1$, which are involved in human and mouse gamete fusion. **Journal of Cell Science**, v. 119, n. 3, p. 416-424, 2006.

10. ANEXOS

10.1 ANEXO 1 – Coloração de Azul de Tripiano e Giemsa

Técnica de **coloração de Azul de Tripiano e Giemsa** (ATG), descrita por Kovacs e Foote (1992).

- Solução estoque de Giemsa: Misturar os reagentes (5 g de Giemsa Merck) + 330 mL de glicerol) e colocar no banho maria a 50°C por 1 h.
- Homogeneizar a solução a cada 15 min e manter protegido da luz em vidro âmbar.
- Deixar esfriar e acrescentar 330 mL de metanol.
- Maturar a solução em frasco âmbar por no mínimo 15 dias à temperatura ambiente antes de usar (agitar o frasco a cada 5 dias).
- Filtrar em papel-filtro quando for utilizar e armazenar sem contato com a luz.
- Solução Giemsa para uso: Preparar a solução de trabalho no dia do uso- Diluir 8 mL de água destilada (pH= 6,8 a 7,1) com 4 mL de corante Giemsa estoque e homogeneizar a solução.

Procedimento para preparação da amostra

1. Misturar 15 µL de sêmen com 15 µL do corante azul de tripano a 0,4% (1:1 v/v; Sigma, T-8154) em tubo de 1,5 mL e incubar por 15 min a 37°C (espermatozoides devem estar vivos).
2. Fazer três esfregaços usando 3 a 4 µL da amostra.
3. Secar os esfregaços rapidamente em fluxo de ar ou secador.
4. Fixar os esfregaços em álcool absoluto por 5 min e deixar as lâminas secarem.
5. Corar os esfregaços por no mínimo 40 min com a solução de Giemsa uso (na estufa a 38,5°C).
6. Lavar lâminas em água corrente e deixar secar para fazer a leitura.
7. Avaliar 100/200 espermatozoides em microscópio de campo claro em aumentos de 400x e 1.000x.

Modo de avaliação

Espermatozoides com a cabeça azul e com acrossoma rosa escuro devem ser considerados mortos com acrossoma íntegro.

Espermatozoides com a cabeça azul e com acrossoma descolorado devem ser considerados mortos com reação acrossomal.

Espermatozoides com a cabeça rosa clara e com acrossoma rosa escuro devem ser considerados vivos com acrossoma íntegro.

Espermatozoides com a cabeça rosa claro e com acrossoma descolorado devem ser considerados vivos com reação acrossomal.

10.2 ANEXO 2 – Coloração com clortetraciclina (CTC) combinada com Hoechst

Para avaliar a capacitação espermática *in vitro* será utilizada a técnica de clortetraciclina (CTC), descrita por Pérez *et al.* (1996) modificada.

1. Aquecer 5 mL de solução tampão-CTC à 37°C;
2. **Preparar a solução de CTC (pH= 7,8):** Diluir 2 mg de CTC + 4,4 mg de L-cisteína em 5 mL de tampão-CTC (240 mg de TRIS + 760 mg NaCl em 100 mL de água destilada). Filtrar e guardar a 4°C.
3. Aliquotar 30 µL de solução CTC, 10 µL de Hoechst, 2 mL de PVP em PBS, 8 µL de PFM (paraformaldeído) cada um em tubos de microcentrífuga e colocar na estufa à 37 °C.
4. Fazer a técnica de minipercoll conforme o protocolo do experimento.
5. Misturar 190 µL da solução (SPERM-Talp+espermatozoides) com 10 µL da solução de Hoechst a 10 µg/mL (40 µg em 60 mL de PBS).
6. Incubar por 2 min.
7. Adicionar 2 mL de solução de PVP à 2% em PBS.
8. Centrifugar a amostra à 700 g por 5 min.
9. Remover o sobrenadante.
10. Ressuspender o *pellet* em meio de capacitação.
11. Adicionar 45 µL da solução de CTC fresco, preparado no dia.
12. Após 20 s, adicionar 8 µL de uma solução de PFM a 12% em 0,5 M de TRIS (PH=7,4).
13. Colocar uma gota de 10 µL da amostra corada entre lâmina e lamínula.
14. Pressionar para remover o excesso.
15. Selar com esmalte incolor.
16. **Ler em epifluorescência com filtro de 355-425 nm na linha de excitação com emissão de fluorescência em filtro RKP 455.**

10.3 ANEXO 3 – Meio para indução de reação acrossômica

(QUEIROZ, Vinicius de Seixas, 2003)

Uma vez que a massa de íon Ca^{2+} (Calcium Ionophore A23187, Free Acid; Sigma, Product Number C7522) presente na embalagem original do produto era de 5 mg, considerou-se conveniente diluir todo produto, diretamente em sua embalagem, com o volume adequado de DMSO, evitando perdas e erros de pesagem.

Soluções Estoque:

- **Solução Mãe de Ca^{2+} Ion/DMSO:** 5 mg de Ca^{2+} Ion foram diluídos em 2,387 mL de DMSO p.A., permitindo uma concentração de Ca^{2+} Ion nessa solução igual a 4 mM (2,097 mg/mL).
- **Solução estoque de Ca^{2+} :** 25 μL da Solução Mãe de Ca^{2+} Ion/DMSO foram diluídos em 975 μL de meio SPERM-Talp 1,2X, permitindo a concentração de 2,5% para o DMSO e 100 μM (52,368) para o Ca^{2+} Ion. Essa solução foi dividida em alíquotas de 30 μL , colocadas em tubos de microcentrifugas e mantidas a -20°C , até o dia do ensaio.

Solução de Trabalho:

- **Solução Ca^{2+} a 2 μM :** No dia do ensaio, 10 μL da Solução Estoque de Ca serão diluídos em 490 μL do SPERM-Talp com 5% SFB, permitindo a concentração de 0,05% para o DMSO e 1 μM (1,047 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para o Ca^{2+} Ion.
- **Solução Ca^{2+} a 1 μM :** No dia do ensaio, 10 μL da Solução Estoque de Ca serão diluídos em 990 μL do SPERM-Talp com 5% SFB, permitindo a concentração de 0,025% para o DMSO e 1 μM (0,5235 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para o íon Ca^{2+} .