

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

**MODELO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS SEM ZONA
PELÚCIDA**

Louise Fontoura Köhler

PORTO ALEGRE

2021/1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA

**MODELO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS SEM ZONA
PELÚCIDA**

Autor: Louise Fontoura Köhler
**Trabalho apresentado à Faculdade de
Veterinária como requisito parcial para a
obtenção da graduação em Medicina
Veterinária.**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bertolini

PORTO ALEGRE

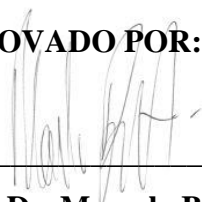
2021/1

Louise Fontoura Köhler

**MODELO DE FECUNDAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS SEM ZONA
PELÚCIDA**

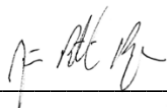
Aprovado em 23 NOV 2021

APROVADO POR:



Prof. Dr. Marcelo Bertolini

Orientador e Presidente da Comissão



Prof. Dr. João Batista de Souza Borges

Membro da Comissão



Profa. Dra. Ana Paula Gonçalves Mellagi

Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

À toda minha família, principalmente meu pai e minhas mães (minha tia inclusa), pelo apoio e incentivo e por me proporcionarem estudar na Universidade Federal do Rio Grande do Sul, o que antes parecia um sonho muito distante.

Aos meus amigos e colegas pela ajuda, incentivo e companhia.

Aos meus orientadores, Professores Marcelo Bertolini e José Luiz Rigo Rodrigues por tudo que me ensinaram e por todo tempo que dispenderam em me orientar ao longo destes quatro anos de estágio, ao Eduardo Sanguinet que foi meu parceiro em boa parte dos meus trabalhos, e aos demais colegas do Laboratório de Embriologia e Biotécnicas da Reprodução da UFRGS.

RESUMO

Modelo de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos sem zona pelúcida

A capacitação (CA) e a reação acrossômica (RA) são fenômenos espermáticos essenciais para a fecundação do oócito em mamíferos, e podem ser reproduzidos *in vitro*. Este estudo teve como objetivo avaliar as taxas de fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos bovinos com e sem zona pelúcida (ZP) utilizando espermatozoides bovinos após a indução da CA e RA *in vitro*, como modelo para aplicação em outras espécies mamíferas. Para tanto, complexos *cumulus*-oócito (CCOs) foram maturados *in vitro* (MIV) por 24 h, e após 18 h, um grupo de CCOs foi desnudado e oócitos maduros foram submetidos à remoção enzimática da ZP, enquanto outro grupo foi ativado partenogeneticamente com uso de ionomicina. Sêmen bovino foi descongelado a 37°C por 50 s e centrifugado em gradiente de Mini-Percoll. Os espermatozoides foram capacitados em meio sem ou com 10 UI/mL de heparina por 2 h. Após 15 min, uma fração dos espermatozoides foi submetida à indução da RA após exposição a uma solução de cálcio Ionóforo (1 µM) em PBSm. As taxas de CA e RA, e a viabilidade espermática (VE) foram avaliadas pelas colorações de clortetraciclina, e de azul de Tripiano e Giemsa, respectivamente. A FIV foi realizada após 24 h de MIV com espermatozoides capacitados (oócitos com ZP, grupo FIV) ou reagidos (oócitos sem ZP, grupo FIV ZF). Após 18 h de FIV ou ativação, todas as estruturas foram coradas com bisbenzimidida (15 µg/mL) para avaliação da configuração da cromatina. As taxas de CA, RA e de VE foram de 43%, 29% e 84%, respectivamente. As taxas de fecundação não diferiram entre os grupos de FIV e FIV ZF, e tais taxas não diferiram da taxa de ativação dos oócitos paternotos, utilizados como controle (40, 44 e 47%, respectivamente). No entanto, as taxas de polispermia foram mais altas entre os oócitos com zona pelúcida em comparação com os oócitos sem zona (12 e 2%, respectivamente, $p \geq 0,05$). Parte das estruturas foi colocada em cultivo para avaliação da clivagem, não havendo diferença entre os grupos FIV e FIV ZF (53 e 64%, respectivamente). Concluímos que o modelo de oócitos bovinos sem ZP permite a FIV monospermica, com baixa taxa de polispermia, ainda necessitando de ajustes no protocolo. Como perspectiva, este modelo deverá ser utilizado no futuro para a FIV interespecies, como para a espécie equina.

Palavras-chave: Capacitação espermática. Reação acrossômica. Fecundação *in vitro*. Bovinos. Equinos.

ABSTRACT

An in vitro fertilization model using bovine zone-free oocytes

Sperm capacitation (SC) and acrosome reaction (AR) are essential processes for oocyte fertilization in mammals, a procedure also attainable in vitro. This study aimed to assess in vitro fertilization (IVF) rates of zona pellucida (ZP) intact and zona-free bovine oocytes using bull sperm cells after in vitro SP and AR induction, for use as a model for application in other mammalian species. For this purpose, cumulus-oocyte complexes (COCs) were in vitro-matured (IVM) for 24 h, a group of matured COCs were denuded and subjected to ZP removal by protease after 18 h in IVM. Bovine frozen semen was thawed at 37°C for 50 s and centrifuged through a Mini-Percoll gradient. Sperm cells were incubated in medium without or with 10 IU/mL of heparin for 2 h. After 15 min, a fraction of sperm cells was acrosome reacted with calcium ionophore (1 µM). SC and AR rates, and sperm viability (SV) were evaluated by chlortetracycline (CTC) and Trypan blue with Giemsa stains, respectively. IVF was performed after 24 h of IVM with capacitated (oocytes ZP intact, IVF group) or reacted (zona-free oocytes, IVF-ZF group) sperm cells, while another matured COCs group was activated parthenogenetically using ionomycin (5 µM). All structures were stained using bisbenzimidazole (15 µg/mL) to assess the chromatin configuration 18 hpf. The SC, AR and SV rates were 43%, 29% and 84%, respectively. No differences in fertilization rates were detected between IVF and IVF-ZF groups and the activation rate (40, 44 and 47%, respectively). However, polyspermy rates were higher in ZP intact oocytes compared to zona-free oocytes (12 and 2%, respectively, $p \geq 0,05$). Furthermore, cleavage rates after 24 h of in vitro culture (IVC) did not differ between IVF and IVF-ZF groups (53 and 64%, respectively). In conclusion, the bovine zone-free oocyte model allowed similar monospermic IVF rates to controls, with a low rate of polyspermy. Nevertheless, the protocol still requires development and adjustments. As a perspective, this model should be used in the future for interspecies IVF, such as for the equine species.

Keywords: Sperm capacitation. Acrosome reaction. In vitro fertilization. Bovine. Equine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - A ligação das proteínas IZUMO1R (identificada como Juno, em verde), na superfície do oócito e IZUMO (em vermelho), na região equatorial do espermatozoide (1). Translocação da IZUMO1R para vesículas após a fecundação (2; Fonte: BIANCHI; WRIGHT, 2014)..... 23
- Figura 2 - Padrões de coloração com Giemsa e Azul de Tripano em espermatozoides bovinos, sob microscopia de luz em magnitude de 1000×. Fonte: da autora..... 31
- Figura 3 - Padrões de coloração com clortetraciclina (CTC) de espermatozoides bovinos criopreservados, sob microscopia de epifluorescência em magnitude de 1000×. (a) Padrão NCA; (b) padrão CA; (c) padrão RA. Fonte: da autora. 31
- Figura 4 - Imagens representativas de oócitos fecundados in vitro. a) Oócito em metáfase II indicado pela seta verde. b) Oócito ativado partenogeneticamente, com seta branca indicando 1PN. c) Oócito fecundado in vitro, com 2PN. d) Oócito com fecundação polispérmica, com seta cinza indicando a presença de material genético do espermatozoide em descondensação, e ao lado, espermatozoides não descondensados, e) Oócito fecundado in vitro não ativado, com seta cinza indicando a presença de material genético do espermatozoide em descondensação e seta verde indicando a cromatina em metáfase II. Microscopia de epifluorescência, em bisbenzimidida (Hoechst 33342), sob magnitude de 1000X. Fonte: da autora..... 32

- Figura 5 - Taxas de sobrevivência e capacitação espermática de sêmen bovino congelado, incubados por 0, 15 min e 2 h em 0 ou 10 UI/mL de heparina. No eixo X são apresentadas as representações das porcentagens de espermatozoides em cada etapa do processamento: após o Mini Percoll (Percoll, em barras pretas), logo após a diluição em meio sem (0 UI 0h, em barras azul escuras) ou com adição de heparina (10 UI 0h, em barras azul claras), após 15 min de incubação em heparina (15 min, em barras verde escuras), após a indução da reação acrossômica com cálcio ionóforo (Reação, em barras verde claras), e após duas horas de incubação em meio sem (0 UI 2h, em barras laranjas) ou com adição de heparina (10 UI 2h, em barras amarelas). No eixo Y, são apresentadas as legendas da classificação dos espermatozoides em mortos, não capacitados (NCA), capacitados (CA) e reagidos (RA). a-c: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$)..... 34
- Figura 6 - Taxas de ativação partenogênética, de fecundação *in vitro* convencional (FIV) e de fecundação *in vitro* sem zona pelúcida (FIV ZF) em bovinos ($p \geq 0,05$)..... 35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Média (%) de espermatozoides bovinos mortos, não capacitados, capacitados e reagidos após o processo de segregação e o período de incubação sem (-) e com (+) 10 UI/mL de heparina após a avaliação com a coloração com CTC e azul de tripano.....	33
Tabela 2 - Resposta média (%) de espermatozoides bovinos após a indução da capacitação com 10 UI/mL de heparina e da reação acrossômica com 1 μ M de cálcio ionóforo (A23187).....	34
Tabela 3 - Avaliação da configuração de cromatina em oócitos bovinos com e sem zona pelúcida 18 h após a fecundação <i>in vitro</i>	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA	Capacitação espermática
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CCO(s)	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CO ₂	Dióxido de carbono gasoso
CP	Corpúsculo polar
CTC	Cloridrato de clortetraciclina
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
hpf	Horas pós-fecundação
IETS	Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões
iTNCS	Clonagem por transferência nuclear de célula somática interespecie
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
OPU	Aspiração folicular de COC guiada por ultrassonografia (<i>Ovum pick up</i>)
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PN	Pronúcleo
RA	Reação acrossômica
SFB	Soro Fetal Bovino
TALP	Meio de Tyrode com albumina, lactato e piruvato (modified Tyrode's albumin lactate pyruvate médium)
TCM-199	Meio de cultivo de tecido (<i>tissue culture medium 199</i>)
%	Porcentagem
h	Hora
M	Molar
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milimetro

nm	Nanômetro
s	Segundo
UI	Unidade internacional
ZF	Oócitos sem zona pelúcida (<i>zona-free oocytes</i>)
ZP	Zona pelúcida
µg	Micrograma
µL	Microlitros
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	16
2.1.1	Histórico.....	16
2.1.2	FIV em bovinos.....	17
2.1.3	Técnica de FIV.....	18
2.1.3.1	Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	18
2.1.3.2	Segregação espermática.....	18
2.1.3.3	Capacitação espermática e reação acrossômica.....	19
2.1.3.4	Fecundação.....	21
2.1.4	FIV de oócitos sem zona pelúcida e FIV interespécies.....	24
2.2	Partenogênese.....	25
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	Objetivo Geral.....	26
3.2	Objetivos Específicos.....	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	Local de Realização do Estudo e Delineamento Experimental.....	27
4.1.1	Local de Realização do Estudo.....	27
4.1.2	Delineamento Experimental	27
4.2	Meios e Reagentes.....	27
4.3	Maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	27
4.4	Remoção da zona pelúcida de oócitos maturados e visualização dos corpúsculos polares.....	28

4.5	Ativação partenogénica química dos oócitos maturados.....	29
4.6	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV) de oócitos bovinos com e sem zona pelúcida.....	29
4.7	Processamento do sêmen.....	29
4.7.1	Segregação espermática.....	29
4.7.2	Indução da capacitação espermática e reação acrossômica <i>in vitro</i>	30
4.8	Determinação da viabilidade celular.....	30
4.9	Determinação da capacitação espermática e reação acrossômica induzidas <i>in vitro</i>.....	31
4.10	Avaliação da configuração (status) de cromatina após a FIV.....	32
4.11	Análise estatística.....	32
5	RESULTADOS.....	33
6	DISCUSSÃO.....	37
7	CONCLUSÕES.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A história dos esforços em se produzir *in vitro* (PIV) embriões em espécies mamíferas por meio do procedimento de fecundação *in vitro* (FIV) se inicia na década de 1930, com Gregory Pincus, estando atualmente consolidada nas espécies humana e bovina (FAUSER; EDWARDS, 2005; SJUNNESSON, 2020). De forma simplificada, o procedimento consiste no co-cultivo de oócitos maturados e espermatozoides capacitados *in vitro* em laboratório, resultando na fecundação e posterior desenvolvimento embrionário (BERTOLINI; BERTOLINI, 2009). Portanto, o desenvolvimento da técnica só foi possível após o descobrimento do fenômeno da capacitação espermática (CA), em 1951, por dois grupos independentes, Collin Russel Austin, na Austrália, e Min Chueh Chang, nos Estados Unidos (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). Foi Chang também quem produziu o primeiro mamífero nascido vivo pela FIV em 1959, utilizando o coelho como modelo experimental, seguido por Whittingham em 1968, em camundongos (CHANG, 1959; WHITTINGHAM, 1968). Dez anos depois, nasceu Louise Brown, fruto do primeiro procedimento de sucesso na FIV humana (STEPTOE & EDWARDS, 1978). No ano de 1981 nasceu o primeiro produto de FIV na espécie bovina, o bezerro Virgil, obtido a partir de oócitos maturados *in vivo* e recuperados cirurgicamente (BRACKETT *et al.*, 1982). No entanto, o primeiro bovino produzido totalmente *in vitro* foi obtido em 1987 (LU *et al.*, 1987). Atualmente a técnica se encontra comercialmente estabelecida nesta espécie, com mais de um milhão de embriões bovinos produzidos no mundo durante o ano de 2019, com o Brasil figurando como o segundo maior produtor, com 300 mil embriões produzidos reportados à IETS (Sociedade Internacional de Tecnologia de Embriões), atrás apenas dos Estados Unidos (VIANA, 2020).

Apesar de tais casos de sucesso em bovinos, a FIV convencional não é uma realidade consolidada em equinos, uma vez que existem apenas dois relatos de potros nascidos pela técnica (PALMER *et al.*, 1991, BÉZARD *et al.*, 1992). Segundo levantamento de Leemans *et al.* (2016), apesar de haver relatos de sucesso quanto à fecundação e clivagem *in vitro*, as taxas de embriões que se desenvolvem até os estádios de mórula e blastocisto em equinos são baixas e variáveis. Dois entraves são citados pelos pesquisadores como possíveis responsáveis pela ineficiência do processo: a dificuldade em estabelecer um protocolo de capacitação espermática *in vitro* e consequente reação acrossômica eficiente, e o fenômeno de zona *hardening*, causado pela liberação prematura de grânulos corticais dos oócitos, sendo que ambos resultam na incapacidade dos espermatozoides em ultrapassar a zona pelúcida dos gametas femininos (DELL'AQUILA *et al.*, 1999; TREMOLEDA *et al.*, 2003, MUGNIER *et al.*, 2009). Na busca

pela eficiência da FIV equina, diversos autores têm buscado desenvolver protocolos para a capacitação *in vitro* dos espermatozoides, que aparentemente, deixaram um tanto de lado um dos aspectos importantes da fecundação, que é a reação acrossômica *per se*. Desta forma, nenhum protocolo confiável e com repetitividade de fecundação *in vitro* foi estabelecido em equinos até o momento (revisado por LEEMANS *et al.*, 2016). Além disso, a escassa disponibilidade de ovários e de oócitos equinos, a baixa taxa de recuperação oocitária de folículos ovarianos de éguas, e a ineficiente resposta das éguas aos protocolos de superovulação também limitam a aplicação da técnica (ALLEN, 2005).

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. Ao longo deste percurso, a presença de glicosaminoglicanos (GAG), presentes em grandes quantidades no interior do trato reprodutivo da fêmea, principalmente durante o estro, induzem a capacitação espermática (PARRISH *et al.*, 1989; SUAREZ; PACEY, 2006; BLONDIN *et al.*, 2009; MELLO *et al.*, 2016). *In vitro*, a capacitação é promovida pela heparina, um GAG cuja eficácia em induzir a capacitação espermática *in vitro* foi observada e descrita por Parrish *et al.* (1986), com o uso do sêmen bovino, e vem sendo utilizada em diversos laboratórios até os dias atuais (PARRISH, 2014).

Além da capacitação espermática, para adquirir capacidade fecundante o espermatozoide deve passar também pela reação acrossômica, como demonstrado em estudos de mecanismos de fecundação utilizando FIV de oócitos sem zona pelúcida e espermatozoides de diferentes espécies (YANAGIMACHI, 1972; YANAGIMACHI; YANAGIMACHI; ROGERS, 1976). A reação acrossômica (RA) também pode ser induzida *in vitro*, com o uso moléculas que mimetizam ou desencadeiam o processo, como o cálcio ionóforo (BYRD, 1981). O processo de RA ocorre fisiologicamente pelo contato do espermatozoide capacitado com a ZP, permitindo então a penetração.

Hoje, a PIV em determinados modelos animais e também na espécie humana 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*, devido ao 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).

Como a reação acrossômica pode ser induzida *in vitro* utilizando o modelo de capacitação e de reação acrossômica de Yanaguimachi *et al.* (1986) com oócitos sem zona pelúcida, neste estudo buscou-se estabelecer um protocolo para a manipulação de

espermatozoides bovinos de sêmen descongelado, induzindo a capacitação espermática e a reação acrossômica *in vitro* utilizando heparina e cálcio ionóforo (A23187), respectivamente, com vistas a permitir o ancoramento/adesão do espermatozoide ao oolema de oócitos bovinos sem zona pelúcida, seguida da penetração e ativação do oócito, a fecundação *per se*, a formação de pronúcleos, clivagem e o subsequente desenvolvimento embrionário. Utilizou-se a espécie bovina como modelo, por ser uma espécie tecnicamente bem estabelecida, 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.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fecundação *in vitro* (FIV)

2.1.1 Histórico

A fecundação *in vitro* em espécies de fecundação externa data do final do século XVIII, quando Lazzaro Spallanzani realizou a técnica em rãs, sendo responsável por determinar a importância de ambos os gametas masculino e feminino na geração de um novo indivíduo, contribuindo para o final do debate entre ovistas e espermistas – cientistas que creditavam a origem da vida apenas ao oócito ou ao espermatozoide, respectivamente (RODRIGUES; BERTOLINI, 2019). No século seguinte, em 1887, o austríaco Leopold Schenk buscou realizar a FIV em mamíferos, utilizando coelhos e cobaias, mas não obteve sucesso (revisado por BIGGERS, 2012). Por algum tempo creditou-se a Pincus e Enzmann o primeiro experimento bem-sucedido na FIV, em 1934. Os pesquisadores incubaram oócitos e espermatozoides de coelho *in vitro* e posteriormente lavaram as estruturas e as transferiram para fêmeas receptoras. Apesar de ter resultado em nascidos vivos, hoje acredita-se que a fecundação ocorreu, na verdade, *in vivo* (BAVISTER, 2002).

No entanto, foram trabalhos das décadas de 1950 e 1960 que deram o impulso e a base científica para que a técnica se desenvolvesse (BAVISTER, 2002). Wesley Whitten na década de 1950 e Biggers *et al.* em 1967 propuseram modificações nos meios de cultivo de embriões que embasaram os meios utilizados hoje em diversas espécies (RODRIGUES; BERTOLINI, 2019). Ainda por volta da metade do século XX, Austin e Chang realizaram experimentos independentes em coelhos que demonstraram que os espermatozoides precisam passar um período de pelo menos quatro horas no trato reprodutivo feminino para que estejam aptos a fecundar os oócitos (AUSTIN, 1951; CHANG, 1951). A descoberta desse fenômeno, chamada por Austin de capacitação, possibilitou a realização de diversos experimentos de FIV bem-sucedidos utilizando espermatozoides capacitados *in vivo* e *in vitro* (BAVISTER, 2002).

O primeiro mamífero nascido vivo pela técnica de FIV foi obtido por Chang, em 1959 (CHANG, 1959). Depois dele, outros pesquisadores realizaram experimentos de sucesso utilizando a técnica em outras espécies, como Whittingham, em 1968, com camundongos e Toyoda, em parceria com o próprio Chang, em 1974 utilizando ratos. Naquela oportunidade já consolidada, a primeira FIV, os protocolos descritos resultaram em sucesso na espécie humana,

como nascimento de Louise Brown, em 1978 (STEPTOE & EDWARDS, 1978). Desde então estima-se que aproximadamente seis milhões de crianças tenham nascido através de alguma técnica de reprodução assistida (SJUNNESSON, 2020; HUNTER, 2017). Tratando-se de animais de produção, o primeiro produto de FIV na espécie bovina foi o bezerro Virgil, nascido em 1981 (BRACKETT *et al.*, 1982), a partir de oócitos maturados *in vivo* e de embriões cultivados *in vitro* até estádios iniciais antes da transferência a receptoras, seguido de dois nascimentos na espécie equina em 1991 e 1992 (PALMER *et al.*, 1991, BÉZARD *et al.*, 1992).

2.1.2 FIV em bovinos

Desde os primeiros nascimentos de bezerros obtidos através de procedimento de FIV e PIV relatados por Brackett *et al.*, em 1982, e Lu *et al.*, em 1987, a técnica aplicada aos bovinos evoluiu rapidamente. A FIV em bovinos é muito eficiente, uma vez que aproximadamente 90% dos oócitos aspirados completam a maturação, 80% são fecundados e em torno de 35% atingem o estágio de blastocisto, sendo as espécies bovina e humana as em que a FIV se encontra mais avançada (LONERGAN; FAIR, 2016; SJUNESSON, 2020). De acordo com um levantamento da IETS, no mundo em 2019 mais de um milhão de embriões bovinos foram produzidos *in vitro*. Além disso, a proporção destes embriões que foram de fato transferidos e a proporção de embriões criopreservados aumentaram em relação ao ano anterior, evidenciando como as melhorias na técnica refletem em melhor qualidade dos embriões (VIANA, 2020). O desenvolvimento de condições de cultivo *in vitro* mais adequadas e outras tecnologias, como a coleta de oócitos pela OPU, a utilização de sêmen sexado e a transferência direta de embriões criopreservados impulsionaram o emprego comercial da FIV em bovinos, sobretudo visando a difusão de genética superior entre os rebanhos (BLONDIN, 2017; RODRIGUES; BERTOLINI, 2019; SJUNESSON, 2020).

No entanto, o uso como modelo de pesquisa e estudo do desenvolvimento de embriões *in vitro* também merece destaque. Segundo Parrish (2014), a espécie bovina é uma das mais adequadas a este propósito, principalmente devido à grande disponibilidade de oócitos provindos tanto de OPU quanto de ovários coletados em abatedouros, contando com mais de 1000 publicações sobre o assunto na plataforma Pub Med apenas entre 2011 e 2014.

2.1.3 Técnica de FIV

A fecundação *in vitro*, segundo Bertolini e Bertolini (2009), abrange três etapas: coleta e maturação *in vitro* (MIV) de complexos *cumulus*-oócito (CCO), incubação dos CCO maturados e espermatozoides capacitados *in vitro* (FIV), e cultivo *in vitro* (CIV) dos prováveis zigotos até o estágio que permita a transferência para as fêmeas receptoras (as duas primeiras etapas serão abordadas mais detalhadamente a seguir).

2.1.3.1 Maturação *in vitro*

A maturação oocitária é um evento fisiológico que engloba modificações citoplasmáticas e nucleares, que resulta em um oócito preparado para a fecundação e apto à proporcionar o desenvolvimento embrionário inicial (HYTTEL *et al.*, 1997). SIRARD *et al.* (2006) propõem dividir a maturação oocitária em três etapas: maturação nuclear, citoplasmática e molecular. A maturação nuclear é caracterizada pela progressão da divisão meiótica do oócito, que desde a vida fetal está estagnada na fase de diplóteno da prófase I, até a metáfase II (MII). *In vivo*, essa progressão é estimulada pelo pico pré-ovulatório de LH (Hormônio Luteinizante), enquanto *in vitro*, esta é desencadeada pela retirada do oócito do folículo e fluido folicular. Isso faz com que nos oócitos maturados *in vitro* possa ocorrer uma assincronia entre a maturação nuclear e a maturação citoplasmática (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). Durante a maturação citoplasmática ocorre a deposição de lipídeos, redução do complexo de Golgi, organização de ribossomos ao redor do núcleo e alinhamento de grânulos corticais na periferia oocitária, constituindo um mecanismo de bloqueio de poliespermia (HYTTEL *et al.*, 1997). A maturação molecular, se caracteriza pela produção e estocagem no ooplasma de RNAs mensageiros e proteínas relacionadas à competência oocitária (SIRARD *et al.*, 2006).

2.1.3.2 Segregação espermática

A preparação do sêmen para o uso na FIV envolve procedimentos de segregação dos espermatozoides móveis dos espermatozoides imóveis ou mortos, de diluentes, crioprotetores

e plasma seminal. Este processamento é importante principalmente quando se trata do sêmen congelado, pois estima-se que cerca de 30 a 70% das células espermáticas permaneçam móveis após a criopreservação. Apesar das amostras criopreservadas também apresentarem menor sobrevivência em cultivo quando comparadas com amostras seminais recém coletadas (frescas), as taxas de fecundação podem ser ajustadas modificando tanto o número de espermatozoides por oócito quanto a concentração de heparina utilizada para indução da capacitação espermática *in vitro* (PARRISH; KROGENAES; SUSKO-PARRISH, 1995, PARRISH, 2014).

Um dos métodos utilizados com este propósito é o *swim up*, ou de migração ascendente, que consiste em depositar o sêmen sob uma coluna de meio, incubando-o por um período de 1 hora para que os espermatozoides móveis atinjam a superfície. Esta técnica resulta em uma taxa de motilidade muito alta, próxima de 100%, porém em baixa recuperação em número de células (PARRISH *et al.*, 1986; PARRISH, 2014). Para contornar esse problema, adaptou-se da espécie humana a técnica de gradiente descontínuo de Percoll[®] (PARRISH, 2014). O Percoll[®] é uma das preparações comerciais de substâncias coloidais utilizadas para a separação espermática por centrifugação por gradiente de densidade, em que se deposita o sêmen sobre uma coluna geralmente formada por duas camadas, de 45% de Percoll[®] logo abaixo do sêmen, e 90% na base. Existem variações, como o Mini Percoll[®], que buscam reduzir tanto a quantidade de Percoll[®] utilizado quanto o tempo de centrifugação, visando reduzir o custo e o tempo de preparação da amostra (MACHADO *et al.*, 2009).

Apesar destas duas técnicas, em especial o Percoll[®], serem as mais utilizadas, outras formas de seleção espermática podem ser usadas e apresentam vantagens e desvantagens. Dois exemplos são a lavagem, que apesar de muito simples e barata, apenas separa as células do plasma seminal e diluente, resultando em um pellet tanto de células móveis quanto imóveis, e a filtração em lã de vidro, que tem alta eficiência em separar os espermatozoides viáveis dos outros componentes da amostra, mas com maior custo (PARRISH; KROGENAES; SUSKO-PARRISH, 1995; PESSOA, 2016).

2.1.3.3 Capacitação espermática e reação acrossômica

Desde que em 1951 Austin e Chang apontaram a influência do ambiente uterino na capacidade de fecundação dos espermatozoides, diversos autores buscaram entender o mecanismo de interação entre os gametas masculinos e o trato reprodutivo feminino. A capacitação é um conjunto de modificações bioquímicas que resultam em alterações no padrão de motilidade dos espermatozoides (hiperativação) e na membrana espermática, concedendo a estes a habilidade de ligar-se à zona pelúcida (ZP), desencadeando a reação acrossômica que permite a passagem pela ZP e, subsequentemente, a fusão de membranas e penetração no oócito (YANAGIMACHI, 1981).

Yanagimachi (1981) examinou a distribuição dos espermatozoides pelo útero de fêmeas hamsters após a cópula e observou que os espermatozoides se associavam ao epitélio da junção útero-tubárica e do istmo antes de continuarem a ascensão até atingir a ampola, onde encontram e fecundam os oócitos, sugerindo que este comportamento tenha relação com a capacitação espermática. De fato, os espermatozoides aderem às criptas do istmo, no reservatório espermático, onde interagem com produtos de secreção do epitélio (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). O fluido tubárico possui pH e níveis de bicarbonato mais elevados que o plasma sanguíneo, além de conter glicosaminoglicanos (GAGs) não-sulfatados, como o ácido hialurônico, e sulfatados, como o sulfato de condroitina, sulfato de heparano e heparina, encontrados em alta concentração na fêmea bovina (LEESE, 1988; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007).

In vitro, a heparina vem sendo usada como agente indutor da capacitação em laboratórios do mundo todo. Acredita-se que a heparina se ligue a proteínas presentes na membrana espermática, as denominadas proteínas de ligação espermática (“*sperm binding proteins*”, BSPs), que proveem do plasma seminal e interagem com o colesterol e fosfolípidos da membrana agindo como agentes descapacitantes (MANJUNATH; THÉRIEN, 2002; PARRISH, 2014). Ao se ligar a estas proteínas, a heparina promove a remoção do colesterol e fosfolípidos, causando uma desestabilização e aumento na fluidez da membrana, levando à hiperativação. A hiperativação é caracterizada por vigorosos batimentos da cauda do espermatozoide, que o auxilia na passagem pelo *cumulus oophorus* e pela ZP (YANAGIMACHI, 1981). Esta desestabilização causa um aumento das espécies reativas de oxigênio (EROs) da célula, podendo levar à morte celular, já que o espermatozoide não dispõe de mecanismos de reparo. Por isso, a capacitação promovida na tuba uterina é seletiva, só permitindo que passem por estas modificações quando próximos do momento da ovulação

(BALL; VO; BAUMBER, 2001; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2007). Além da desestabilização da membrana, outras modificações ocorrem no espermatozoide, tais como: mudança no pH, aumento das concentrações intracitoplasmáticas de cálcio e bicarbonato, exteriorização de receptores, alterações na fosforilação e atividade da proteína quinase A (PKA), levando a um aumento no monofosfato de adenosina cíclico (cAMP; VISCONTI *et al.*, 2011; YANAGIMACHI, 1981; ARCELAY *et al.*, 2008; KRAPF *et al.*, 2010).

Para que ocorra a ligação do espermatozoide ao oolema, é necessário que este tenha passado pela reação acrossômica, uma vez que, como observado por Yanagimachi (1972), espermatozoides com acrossoma intacto dificilmente aderem à membrana oocitária e não conseguem penetrá-la, demonstrando que é necessário um processamento da membrana espermática (YANAGIMACHI, 1972). A reação acrossômica ocorre através da fusão entre a membrana externa do acrossoma e a membrana plasmática do espermatozoide, causando a liberação de enzimas acrossômicas (CHENG *et al.*, 1996) e expondo receptores de membrana necessários para a fecundação do oócito, que serão abordados no próximo item. Esse processo é dependente de cálcio, uma vez que é através do influxo deste íon que ocorrem as fusões entre as membranas em vários locais (CHENG *et al.*, 1996; PARRISH, 2014). A reação acrossômica pode ser induzida *in vitro* por proteínas solubilizadas da ZP ou com cálcio ionóforo (BYRD, 1981; BERGER, 1989).

2.1.3.4 Fecundação

Estando o oócito maturado e os espermatozoides capacitados, é possível que a interação entre os gametas resulte em fecundação (HYTTEL *et al.*, 1997). Esse fenômeno engloba vários processos intrinsicamente dependentes: migração espermática pelo trato reprodutivo da fêmea, resultando em capacitação espermática e posterior reação acrossômica, interação e fusão dos gametas, ativação oocitária e subsequente desenvolvimento embrionário (SATOUEH; IKAWA, 2018).

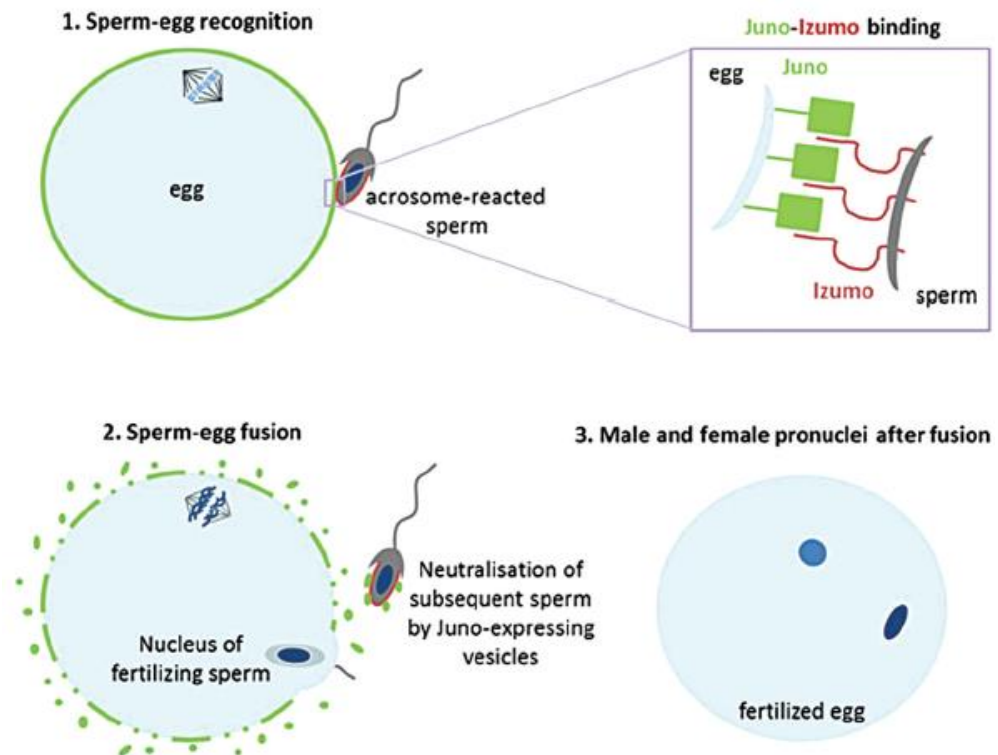
A complexa interação entre as moléculas envolvidas na fecundação foi revisada por Anifandis *et al.* (2014). Primeiro, o espermatozoide precisa passar pelo *cumulus oophorus*, camada de células que circunda o oócito, e acredita-se que duas hialuronidases presentes na membrana acrossômica sejam responsáveis por abrir caminho por esta primeira barreira: Hyal5, que degrada o ácido hialurônico da matriz extracelular, e a Ph-20, que digere as células.

A próxima barreira a ser ultrapassada é a ZP dos oócitos, composta pelas glicoproteínas ZP1, ZP2, ZP3 e ZP4, dependendo da espécie. No caso dos bovinos, os constituintes da ZP são a ZP2, ZP3 e ZP4. A ZP4 é análoga à ZP1 do camundongo, uma glicoproteína estrutural que promove a ligação das demais glicoproteínas e dá estrutura à ZP. Já a ZP3 se liga à zonadesina da superfície do espermatozoide capacitado e desencadeia a reação acrossômica, expondo ligantes da ZP2, que ancora os espermatozoides, e liberando enzimas, entre elas a acrosina, que permitem a penetração espermática na ZP (GOUDET *et al.*, 2008; ANIFANDIS *et al.*, 2014).

Para que ocorra a ligação do espermatozoide ao oolema é necessário que este tenha passado pela reação acrossômica, uma vez que, como observado por Yanagimachi (1972), espermatozoides com acrossoma intacto dificilmente aderem à membrana oocitária e não conseguem penetrá-la. A reação acrossômica promove modificações na membrana espermática e expõe proteínas de ligação, como a desintegrina ADAM2, que se liga à integrina VLA-6 (formada pelas subunidades $\alpha 6$ e $\beta 1$) e à tetraspanina CD9 (molécula que modula e forma agrupamentos de outras proteínas de membrana), resultando na adesão entre os gametas.

No entanto, recentemente duas proteínas ganharam destaque por serem essenciais na interação entre os gametas (SATOUEH; IKAWA, 2018). No espermatozoide, a proteína necessária para a ligação à membrana oocitária é a IZUMO1, uma proteína transmembrana que se localiza nas membranas interna e externa do acrossoma e migra para a região equatorial durante a reação acrossômica (INOUE *et al.*, 2005). A proteína ligante na membrana oocitária é um tipo de receptor de folato 4 (FOLR4) originalmente batizada de JUNO e ambas são conservadas entre as espécies mamíferas (BIANCHI *et al.*, 2014). Mais recentemente a nomenclatura foi modificada para IZUMO1R (SATOUEH; IKAWA, 2018). Existem evidências de que a CD9 estaria envolvida nessa interação, tendo como função agrupar as moléculas de IZUMO1R promovendo uma ligação mais forte entre as membranas. Esse achado é corroborado por dados experimentais, que revelaram que fêmeas que não expressam CD9 apresentam menor capacidade de fecundação, diferente das que não expressam IZUMO1R, que são inférteis (JÉGOU *et al.*, 2011, BIANCHI *et al.*, 2014). No entanto, Bianchi *et al.* (2014) transfectaram células com plasmídeos codificantes de IZUMO1 e IZUMO1R e observaram que a ligação destas proteínas promove apenas a adesão das células, não sendo suficiente para promover a fusão das membranas, sugerindo que mais proteínas estejam envolvidas no processo. Após a fecundação, a IZUMO1R rapidamente é transferida da superfície do oolema para vesículas no espaço perivitelínico, neutralizando outros espermatozoides, conforme ilustrado na Figura 1, constituindo um mecanismo de bloqueio da polispermia.

Figura 1- A ligação das proteínas IZUMO1R (identificada como Juno, em verde), na superfície do oócito e IZUMO (em vermelho), na região equatorial do espermatozoide (1). Translocação da IZUMO1R para vesículas após a fecundação (2; Fonte: BIANCHI; WRIGHT, 2014).



A ligação do espermatozoide ao oolema provoca um influxo de cálcio intracitoplasmático que gera uma rápida despolarização da membrana, constituindo um bloqueio primário da polispermia (YANAGIMACHI, 1981; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). O bloqueio secundário se dá pela ação dos grânulos corticais, que se fundem à membrana do oócito em ondas a partir do ponto onde o espermatozoide se ancorou ao oolema, e liberam seu conteúdo enzimático no espaço perivitelínico, promovendo modificações na ZP, clivando o domínio de ligação da ZP2, impedindo que outros espermatozoides se liguem à zona, em um fenômeno chamado reação de zona ou *zona hardening*, além de modificar as proteínas de ligação na membrana do oócito (HOODBHOY; TALBOT, 1994; GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008). O bloqueio da polispermia parece variar de acordo com a espécie, dependendo em maior ou menor grau do bloqueio de membrana (YANAGIMACHI, 1981).

Ao mesmo tempo, acontece a ativação oocitária, induzida pela fosfolipase C zeta (PLC ζ), provinda do espermatozoide, que através de uma cascata de reações provoca oscilações nos níveis de cálcio intracelular (FERRER-BUITRAGO *et al.*, 2018). O oócito então progride na divisão meiótica, extruindo o segundo corpúsculo polar (GONÇALVES; FIGUEIREDO;

FREITAS, 2008). Já dentro do citoplasma do oócito, o espermatozoide perde seu envelope nuclear e começa a descondensar seu material genético, e os pronúcleos feminino e masculino se aproximam no centro do oócito, e ao final da duplicação do DNA, rompem-se os pronúcleos e forma-se o fuso mitótico da primeira clivagem (YANAGIMACHI, 1981). A formação do pronúcleo masculino é induzida por fatores oocitários, cuja ativação não é espécie-específica, já que estudos de FIV interespecies observaram formação dos pronúcleos após a fecundação (HANADA; CHANG, 1972; YANAGIMACHI, 1972).

2.1.4 FIV de oócitos sem zona pelúcida e FIV interespecies

Em 1962, Beatrice Mintz propôs um modelo de estudo dos mecanismos de fecundação e desenvolvimento embrionário inicial utilizando oócitos sem zona pelúcida. Neste caso, foram utilizados oócitos e embriões murinos em diferentes estádios de desenvolvimento e a zona pelúcida foi removida pela ação da enzima protease, método que segundo a autora é mais eficiente e menos danoso que a remoção mecânica utilizando agulhas (MINTZ, 1962). Oócitos sem zona (ou *zona-free*) foram então utilizados em ensaios de FIV dentro da mesma espécie, já dando evidências do potencial da membrana oocitária no bloqueio de polispermia (HANADA, CHANG, 1972). Posteriormente, a técnica foi empregada utilizando oócitos e espermatozoides de espécies distintas, em modelos de FIV interespecies, como uma alternativa para o estudo de capacitação e reação acrossômica em animais com menor disponibilidade de coleta ou manipulação dos gametas femininos (YANAGIMACHI, 1972; YANAGIMACHI; YANAGIMACHI; ROGERS, 1976). Tais estudos permitiram que se observasse que a zona pelúcida é a principal barreira do oócito contra a penetração por espermatozoides de diferentes espécies, mas a sua remoção apenas reduz a especificidade da fecundação, sem eliminá-la por completo (YANAGIMACHI, 1972; HANADA; CHANG, 1972). Yanaginachi *et al.* (1976) também demonstraram que os espermatozoides só adquiriam a capacidade de se ligar ao oolema após passaram pela reação acrossômica. Desde então, este modelo experimental tem sido esporadicamente usado para a investigação dos mecanismos de fecundação em diversas espécies (PAVLOK, 1979; LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2001; KUMAR *et al.*, 2013). O uso de oócitos de diferentes espécies também vem sendo empregado como citoplastos em rotinas de clonagem por transferência nuclear de células somáticas interespecies (iTNCs; FORELL *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2019).

2.2 Partenogênese

A partenogênese é uma forma de reprodução comum em peixes, anfíbios, répteis e alguns insetos, e é mais comumente caracterizada pelo desenvolvimento de um gameta feminino em um embrião sem o envolvimento do gameta masculino. Em mamíferos, esse fenômeno não ocorre espontaneamente, mas pode ser mimetizado *in vitro*, através de estímulos elétricos ou químicos, utilizando substâncias que simulam a ação do espermatozoide durante a fecundação, como cálcio ionóforo, estrôncio, ionomicina e etanol (BREVINI; GANDOLFI, 2008; MÉO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2008). Embriões mamíferos partenotos não se desenvolvem a termo em função do *imprinting* genômico, repressão de alguns genes tanto no gameta feminino quanto no masculino durante a gametogênese, fazendo com que ambos sejam necessários para o desenvolvimento do indivíduo, com participações mais importantes na formação dos tecidos e dos anexos fetais, respectivamente (MCGRATH; SOLTER, 1984; SURANI; BARTON; NORRIS, 1984). No entanto, embriões partenotos são muito utilizados em rotinas de clonagem após a ativação oocitária como controle da qualidade dos oócitos, e também podem ser fontes de células tronco-embrionárias (BREVINI; GANDOLFI 2008; WANG *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- a) Avaliar as taxas de fecundação *in vitro* monospérmica, polispérmica 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* na produção *in vitro* (PIV) de embriões.

3.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar o *status* de capacitação espermática, reação acrossômica e de sobrevivência *in vitro* de sêmen congelado bovino após exposição à heparina e ao cálcio ionóforo (A23187).
- b) Avaliar as taxas de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos com e sem zona pelúcida com sêmen congelado bovino após a indução *in vitro* da capacitação espermática e da reação acrossômica.

4 METODOLOGIA

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).

4.1.2 Delineamento Experimental

O experimento foi composto por três grupos distintos, sendo dois grupos controle e um grupo experimental. O primeiro grupo, formado por embriões partenotos (oócitos ativados quimicamente), foi utilizado como controle da maturação e competência oocitária. O segundo grupo controle foi composto por oócitos submetidos à FIV convencional, ou seja, complexos *cumulus*-oócito (CCOs) e espermatozoides capacitados *in vitro*. O grupo experimental foi composto por oócitos sem ZP submetidos à FIV, ou seja, *zona-free*, e espermatozoides capacitados e com acrossomas reagidos *in vitro*. A seguir, serão descritos os processos a que os gametas foram submetidos em cada grupo.

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 Maturação *in vitro* (MIV)

Ovários bovinos provenientes de abatedouro foram transportados ao laboratório em solução fisiológica aquecida a 37°C. Após o recebimento e lavagem dos ovários, folículos com diâmetros entre 3 e 8 mm foram aspirados com o auxílio de agulhas 18 G acopladas a seringas de 5 mL para a obtenção dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs), com o conteúdo folicular aspirado armazenado em tubos de centrífuga de 15 mL. Após, esperava-se a decantação das estruturas durante 15 min e a formação de um *pellet*, que era transferido para placas de Petri de 90 mm, sendo diluído com PBS acrescido de 1% de Soro Fetal Bovino (SFB; Invitrogen, Carlsbad, EUA). Realizava-se a busca e seleção morfológica dos CCOs bovinos sob esteromicroscópio, conforme a classificação de Stojkovic *et al.* (2001), utilizando-se apenas CCOs de graus I e II (grau I: CCOs com citoplasma homogêneo e múltiplas camadas de células do *cumulus oophorus*; grau II: CCOs com citoplasma quase homogêneo com apenas algumas áreas de pigmentação irregular e pelo menos cinco camadas de células do *cumulus oophorus*). Após a seleção, os CCOs foram transferidos em grupos de 50 para placas de cultivo de 4-poços contendo meio de maturação *in vitro* composto de TCM-199 suplementado com 2,4 mM de NaHCO₃, 2,2 mg/mL de piruvato de sódio, 50 µM de cisteamina, 1% de solução antibiótica-antimicótica (Estreptomicina, Anfotericina B, Penicilina; 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) e 10% de SFB, cobertas por óleo mineral, permanecendo em incubadora a 38,5°C, umidade saturada e 5% de CO₂ por 18 ou 24 h, dependendo do grupo a que fossem destinados.

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

Após 18 h em MIV, um subgrupo dos CCOs passou pelo processo de remoção das células do *cumulus* por desnudamento em hialuronidase a 0,1% em TCM199 acrescido de 10% de SFB, com agitação em vórtex seguida da remoção mecânica por pipetagem. Posteriormente, selecionavam-se os CCOs com corpúsculo polar, indicativo de maturação nuclear. Os CCOs selecionados eram divididos em dois grupos: (a) Zona-free (ZF), submetidos à remoção da zona pelúcida com protease a 0,5% em TCM199 (controle visual), e (b) partenotos. Em seguida, os

oócitos sem ZP eram alocados individualmente em gotas de 10 μ L de meio de MIV até completar 24 h de maturação.

4.5 Ativação partenogenética química dos oócitos maturados

Completadas as 24 h de MIV, os CCOs maturados selecionados para a ativação partenogenética eram expostos a uma solução de 5 μ M de ionomicina em TCM199 + 10% SFB por 5 min e, imediatamente após, lavados em TCM199 + 10% SFB e transferidos para gotas de meio Fert-TALP, onde eram incubados por 18 h nas mesmas condições da MIV.

4.6 Fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos bovinos com e sem zona pelúcida

Decorridas as 24 h de MIV, as estruturas (com exceção dos oócitos ativados partenogeneticamente) eram lavadas e transferidas para placas de Petri de 35 mm contendo meio Fert-TALP (PARRISH; SUSKO-PARRISH; FIRST, 1988). Para a FIV convencional, foram alocados grupos de 15 CCOs em gotas de 50 μ L. Para a FIV com oócitos sem ZP, foram alocados oócitos individualmente em gotas de 10 μ L. Todas as gotas receberam uma dose de espermatozoides correspondentes ao grupo experimental (FIV convencional: 5 mil espermatozoides capacitados *in vitro* para cada oócito; FIV sem ZP: 100 espermatozoides capacitados e com acrossoma reagido *in vitro* para cada oócito), permanecendo em incubação por 18 h até a avaliação da configuração da cromatina (formação de pronúcleo) e avaliação da fecundação mediante coloração de epifluorescência, conforme item 4.10.

4.7 Processamento do sêmen

4.7.1 Segregação espermática

As palhetas de sêmen bovino de um touro já testado para FIV no nosso grupo de pesquisa e submetido a testes de resposta à heparina e cálcio ionóforo (SANGUINET; 2020) de 0,5 mL foram descongeladas a 37°C por 50 s e submetidos à avaliação de motilidade e vigor entre lâmina e lamínula. Após, passavam pelo processo de segregação espermática por meio da

centrifugação em gradiente descontínuo de Mini-Percoll[®], baseado em Machado *et al.* (2009), com pequenas modificações (300 µL de Percoll 90% e 300 µL de Percoll 45%, com 10 min de centrifugação). Posteriormente, foi feita novamente a avaliação de motilidade e vigor, com a concentração espermática realizada por meio da contagem do número de células em câmara de Neubauer.

4.7.2 Indução da capacitação espermática e reação acrossômica *in vitro*

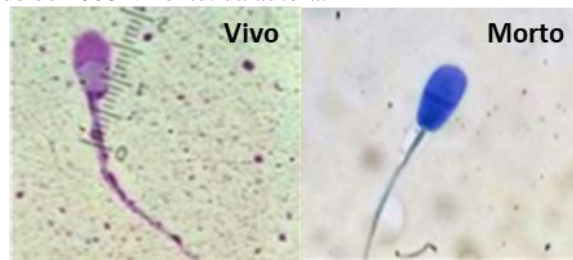
O *pellet* de espermatozoides provenientes do Mini-Percoll[®] foi ressuspensão em meio Fert-TALP sem heparina no grupo controle, ou 10 UI/mL de concentração, para a indução da capacitação espermática. Após 15 min de incubação, parte da amostra incubada com 10 UI/mL de heparina foi utilizada para a FIV dos CCOs e outra parte exposta a 1 µM de cálcio ionóforo por 1 min para indução da reação acrossômica, sendo em seguida utilizada para a FIV dos oócitos sem ZP, conforme descrito no item 4.6. O restante das amostras permanecia em incubação por 2 h.

Ao término de cada etapa do processamento dos espermatozoides, que incluíam as etapas de segregação espermática, de adição aos meios de controle e com heparina nos tempos 0 (t₀), 15 min (t_{15 min}) e 2 h (t₂) de incubação, e de adição do cálcio ionóforo, avaliava-se novamente a motilidade e o vigor de motilidade das células espermáticas, seguido das colorações descritas nos itens 4.8 e 4.9 abaixo, ambas de acordo com o Atlas Embrapa (MARTINS; DODE; SILVA 2015).

4.8 Determinação da viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade espermática ao longo do processamento, amostras de sêmen eram incubadas em solução de Azul de Tripiano a 0,4% por 5 min, sendo então dispostas em esfregaços em lâminas, e fixadas em álcool absoluto. Em seguida, realizava-se a coloração com solução de Giemsa a 0,03%, com incubação por 45 min a 38°C. À leitura em microscopia de luz, em magnitude de 1000x, sob imersão em óleo, células espermáticas consideradas vivas eram coradas em rosa, com as mortas sendo coradas em azul (Figura 3).

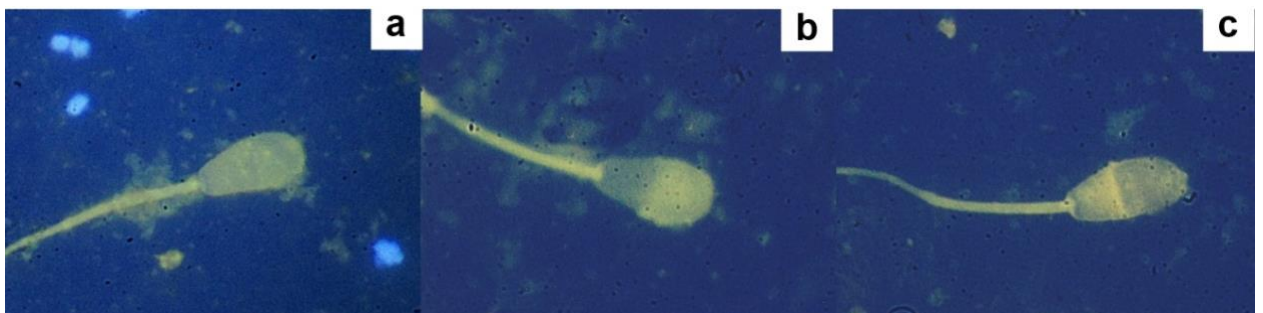
Figura 2- Padrões de coloração com Giemsa e Azul de Tripano em espermatozoides bovinos, sob microscopia de luz em magnitude de 1000×. Fonte: da autora.



4.9 Determinação da capacitação espermática e reação acrossômica induzidas *in vitro*

A avaliação das taxas de capacitação espermática (CA) e de reação acrossômica (RA) *in vitro* dos espermatozoides foi realizada por meio da técnica de coloração fluorescente com clortetraciclina (CTC), descrita por Pérez *et al.* (1996), com modificações. As amostras de sêmen foram incubadas com clortetraciclina (1 mM) por 1 min, fixadas em paraformaldeído a 12% e dispostas entre lâmina e lamínula, sendo armazenadas em geladeira por 6 h ou até a leitura em microscópio de epifluorescência (emissão e excitação de 355 e 425 nm, respectivamente) em aumento de 1000× de magnitude, sob imersão em óleo. Realizava-se a contagem de 200 espermatozoides, observando-se (a) a presença de fluorescência uniforme, caracterizando um espermatozoide não capacitado (NCA), (b) área de baixa fluorescência na região pós-acrossomal, caracterizando um espermatozoide capacitado (CA), e (c) halo de fluorescência na região equatorial da cabeça do espermatozoide, caracterizando-o como com acrossoma reagido (RA; Figura 2). A porcentagem de espermatozoides classificados como NCA, CA e RA na coloração de CTC foi transformada para a proporção de espermatozoides vivos obtida pela coloração de Azul de Tripano e Giemsa.

Figura 3- Padrões de coloração com clortetraciclina (CTC) de espermatozoides bovinos criopreservados, sob microscopia de epifluorescência em magnitude de 1000×. (a) Padrão NCA; (b) padrão CA; (c) padrão RA. Fonte: da autora.



4.10 Avaliação da configuração (*status*) de cromatina após a FIV

A avaliação da fecundação dos oócitos, pelo *status* da cromatina, foi realizada após coloração fluorescente com *bismenzimida* (15 µg/mL), permanecendo a -20°C até a leitura em microscópio de epifluorescência com emissão e excitação de 355 e 425 nm, respectivamente. Foram considerados oócitos em metáfase II (a), com um pronúcleo (1PN; b), com dois pronúcleos (2PN; c), com fecundação polispérmica (mais de um espermatozoide no citoplasma, descondensado ou não, ou mais de dois pronúcleos; d) e fecundados mas não ativados (oócitos em metáfase II com espermatozoide descondensado no citoplasma, e), conforme figura 4.

Figura 4- Imagens representativas de oócitos fecundados *in vitro*. a) Oócito em metáfase II indicado pela seta verde. b) Oócito ativado partenogeneticamente, com seta branca indicando 1PN. c) Oócito fecundado *in vitro*, com 2PN. d) Oócito com fecundação polispérmica, com seta cinza indicando a presença de material genético do espermatozoide em descondensação, e ao lado, espermatozoides não descondensados, e) Oócito fecundado *in vitro* não ativado, com seta cinza indicando a presença de material genético do espermatozoide em descondensação e seta verde indicando a cromatina em metáfase II. Microscopia de epifluorescência, em *bisbenzimidida* (Hoechst 33342), sob magnitude de 1000X. Fonte: da autora.



4.11 Análise estatística

As taxas de viabilidade espermática, de capacitação e de reação acrossômica *in vitro*, assim como e as taxas de fecundação e das proporções das configurações de cromatina foram comparadas entre os grupos experimentais pelo teste do χ^2 ou Teste Exato de Fisher, para $P \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

As taxas de mortalidade do sêmen bovino congelado mostraram-se baixas, tanto após o processamento com gradiente descontínuo de Mini-Percoll (8%), quanto após o período de 2 h de incubação em 10 UI/mL de heparina e após a indução da reação acrossômica pelo cálcio ionóforo (12 e 16%, respectivamente), mesmo com pequeno aumento, sem haver diferença estatística. Os espermatozoides que passaram pela descongelação e pelo Mini-Percoll já mostravam certo grau de capacitação *espontânea* (34%) antes mesmo da indução *in vitro* com heparina, agente capacitante (Tabela 1). Também não observamos diferenças significativas entre as taxas de capacitação espermática comparando as diferentes etapas de avaliações, consistindo imediatamente após o Mini-Percoll (34%), logo após a incubação sem heparina (0 UI/mL; 26%) e com a adição da heparina (10 UI/mL; 39%), e decorridos os 15 min de incubação com o agente capacitante (37%). Após as 2 h de incubação com heparina, embora a taxa de capacitação tenha sido numericamente superior (43%) a outras etapas de avaliações, não houve diferença significativa comparada à taxa após o Mini-Percoll (34%) e em 15 min de incubação em heparina (37%), diferindo dos espermatozoides incubados sem heparina tanto antes quanto depois da incubação (26 e 27%, respectivamente, $p > 0,05$; Tabela 1; Figura 5).

Tabela 1- Proporção (%) de espermatozoides bovinos mortos, não capacitados, capacitados e reagidos após o processo de segregação e o período de incubação sem (-) e com (+) 10 UI/mL de heparina após a avaliação com a coloração com CTC e azul de tripano.

Características espermáticas	Mini-Percoll (%)	Agente capacitante Heparina (10 UI/mL)				
		Tempo de incubação				
		0 h (t0) (%)	0 h (t0) (%)	15 min (t15) (%)	2 h (t2) (%)	2 h (t2) (%)
		-	+		-	+
Mortos	8 ^a	10 ^a	8 ^a	12 ^a	11 ^a	12 ^a
Não capacitados	46 ^{ab}	56 ^a	46 ^{ab}	35 ^b	50 ^a	27 ^b
Capcitados	34 ^{ab}	26 ^a	39 ^{ab}	37 ^{ab}	27 ^a	43 ^b
Acrossomos reagidos	12 ^{ab}	8 ^a	8 ^a	15 ^{ab}	12 ^{ab}	18 ^b

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

A indução da reação acrossômica com cálcio ionóforo ($1 \mu\text{M}$) apresentou a maior taxa de reação acrossômica sendo de 29%, diferindo de todas os outros grupos, como descrito na Figura 5.

Figura 5- Taxas de sobrevivência e capacitação espermática de sêmen bovino congelado, incubados por 0, 15 min e 2 h em 0 ou 10 UI/mL de heparina. No eixo X são apresentadas as representações das porcentagens de espermatozoides em cada etapa do processamento: após o Mini Percoll (Percoll, em barras pretas), logo após a diluição em meio sem (0 UI 0h, em barras azul escuras) ou com adição de heparina (10 UI 0h, em barras azul claras), após 15 min de incubação em heparina (15 min, em barras verde escuras), após a indução da reação acrossômica com cálcio ionóforo (Reação, em barras verde claras), e após duas horas de incubação em meio sem (0 UI 2h, em barras laranjas) ou com adição de heparina (10 UI 2h, em barras amarelas). No eixo Y, são apresentadas as legendas da classificação dos espermatozoides em mortos, não capacitados (NCA), capacitados (CA) e reagidos (RA). a-c: Letras diferentes em cada coluna diferem significativamente ($p \leq 0,05$).

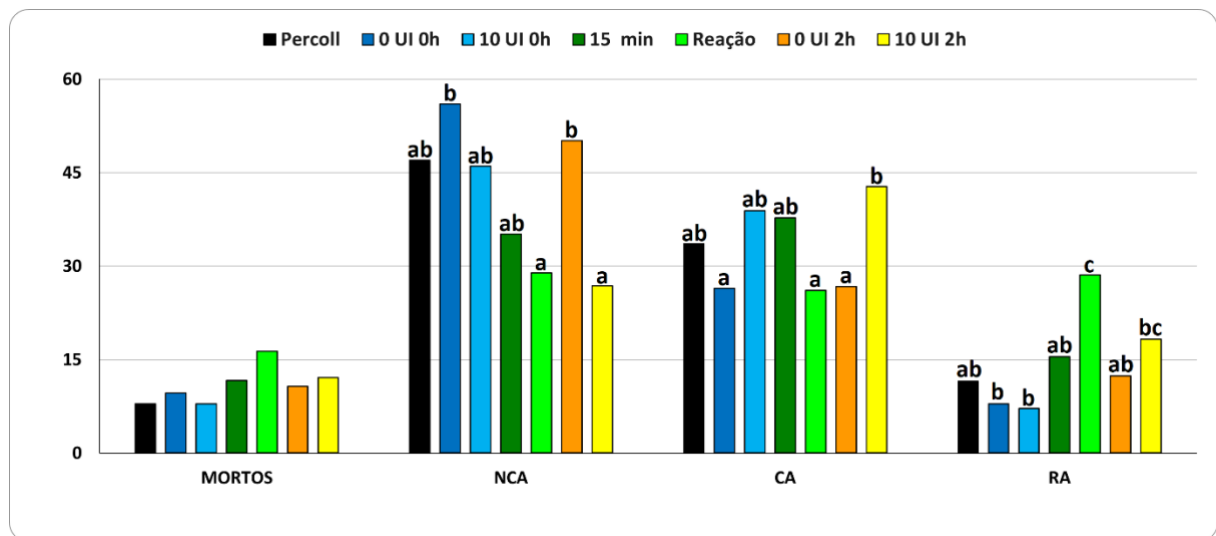


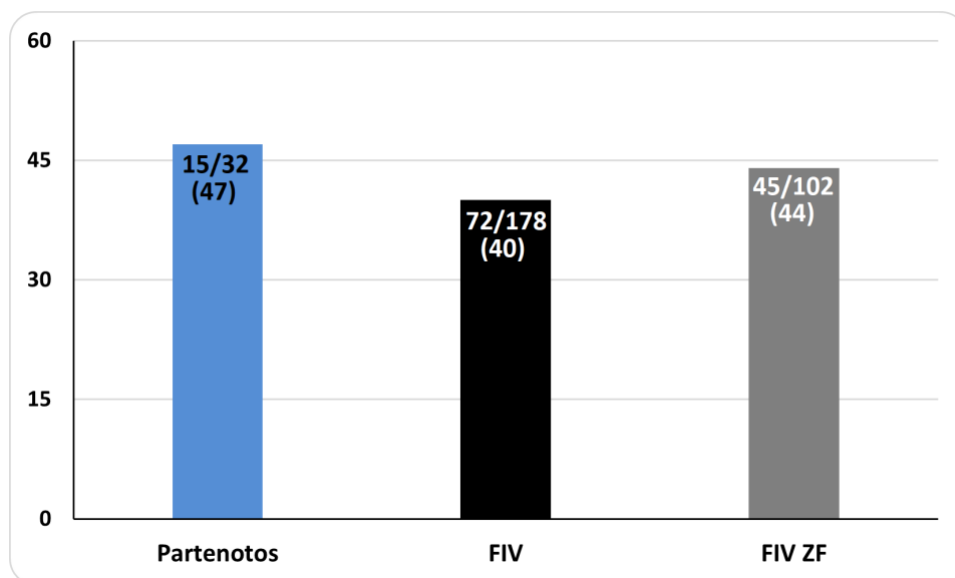
Tabela 2- Resposta média (%) de espermatozoides bovinos após a indução da capacitação com 10 UI/mL de heparina e da reação acrossômica com $1 \mu\text{M}$ de cálcio ionóforo (A23187)

Características espermáticas	Segregação Mini-Percoll (%)	Tempo de incubação 15 min (t15) (%)	Indutor da reação (%)
			Cálcio Ionóforo Cálcio ionóforo $1 \mu\text{M}$
Mortos	8 ^a	12 ^a	16 ^a
Não capacitados	47 ^a	35 ^{ab}	29 ^b
Capacitados	34 ^a	38 ^a	26 ^a
Acrossomas reagidos	12 ^a	15 ^a	29 ^b

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

Na produção *in vitro* de embriões bovinos, um total de 1.033 oócitos (variando de 66 a 300 nas seis replicações) foi submetido à MIV, obtendo-se uma taxa de maturação *in vitro* de 64% (473/687, taxa calculada pela visualização dos corpúsculos polares dos oócitos desnudos 18-20 h após o início da MIV, para a ativação partenogenética ou FIV-ZF), variando de 43 a 74%. O controle da ativação oocitária, caracterizada pela presença de 1 ou 2 pronúcleos (1PN ou 2PN) nos partenotos, foi avaliado nas rotinas 1 e 2 da mesma forma e no mesmo momento (18 hpf) da determinação da taxa de fecundação dos oócitos submetidos à FIV. A taxa de ativação (47%, 15/32) não diferiu das médias das taxas de fecundação dos grupos de oócitos com ou sem ZP (40 e 44%, 72/178 e 45/102, respectivamente). Também na rotina 2, parte das estruturas foi cultivada *in vitro* para a avaliação da taxa de clivagem, resultando em 53 e 64% (8/15 e 9/14 para a FIV convencional e ZF, respectivamente), não havendo diferença estatística entre os grupos. As taxas de fecundação observadas após a fixação e coloração das estruturas nas seis rotinas não diferiu entre os grupos de oócitos intactos (40%, variando de 16 a 86%) e sem zona pelúcida (44%, variando de 29 a 65%; Figura 6).

Figura 6- Taxas de ativação partenogenética, de fecundação *in vitro* convencional (FIV) e de fecundação *in vitro* sem zona pelúcida (FIV ZF) em bovinos ($p \geq 0,05$).



As taxas de oócitos em metáfase II não diferiram entre os grupos, sendo de 53% (17/32) para os oócitos ativados partenogeneticamente, 52% (93/178) para a FIV convencional, e 49% (50/102) para a FIV sem ZP (Tabela 3). Da mesma forma, a taxa de oócitos fecundados mas

não ativados foi igual para os dois grupos de FIV (8 e 3% para a FIV convencional e sem a presença da ZP (*zona free*), respectivamente).

Tabela 3- Avaliação da configuração de cromatina em oócitos bovinos com e sem zona pelúcida 18 h após a fecundação *in vitro*

Fecundação e configuração da cromatina	Partenotos	Fecundação <i>in vitro</i> (FIV)			
		Oócitos com zona pelúcida		Oócitos sem zona pelúcida	
		Total n (%)	Total n/n (%)	Não ativados n/n (%)	Total n/n (%)
Cromatina em MII	17/32 (53) ^{aA}	93/178 (52) ^{aA}	15/178 (8) ^B	50/102 (49) ^{aA}	3/102 (3) ^B
1 pronúcleo (1PN)	13/32(42) ^{aA}	19/178 (11) ^{cB}	-	16/102 (16) ^{cB}	-
2 pronúcleos (2PN)	2/32 (6) ^{bA}	52/178 (29) ^{bB}	-	32/102 (31) ^{bB}	-
Polispermia	-	21/178 (12) ^{cA}	-	2/102 (2) ^{dB}	-
Média de espermatozoides aderidos ao oolema	-	2	-	40	-

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

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

A tabela 3 revela que as taxas de fecundação polispérmica foram maiores nos oócitos com ZP (12%) em comparação aos oócitos sem zona pelúcida (2%). Já a média de espermatozoides ligados ao oolema foi maior nos oócitos sem zona pelúcida (40 espermatozoides por oócito contra 2 nos oócitos com ZP). A taxa de oócitos com ativação espontânea, apresentando um pronúcleo, não diferiu entre os grupos (11 e 16% nos oócitos com e sem zona pelúcida, respectivamente).

6 DISCUSSÃO

Parrish *et al.* (1986) ressaltaram que a criopreservação altera a viabilidade dos espermatozoides, resultando em menor sobrevivência em cultivo quando comparados com espermatozoides provindos diretamente do ejaculado. Os dados do presente experimento, revelaram uma reduzida mortalidade espermática após o descongelamento que se mantiveram baixas mesmo após o processamento do sêmen e a incubação (Tabela 1), o que corrobora as taxas de mortalidade dos espermatozoides bovinos descritas por outros autores (ASSUMPÇÃO *et al.*, 2002; RIBEIRO-PERES *et al.*, 2014; BARRIGA, 2019; SANGUINET, 2020).

A capacitação espermática provavelmente inicia durante o processo de diluição e congelamento do sêmen bovino, que pode promover alterações na membrana espermática ou até mesmo danos devido ao trânsito dos agentes crioprotetores (MCINTYRE *et al.*, 1974; GAO *et al.*, 1997; RICKER *et al.*, 2006; STOREY & STOREY, 2017). O processo de capacitação *in vitro* ocorre com a segregação dos espermatozoides viáveis através de um gradiente de Percoll (cerca de 10-15%), que, por fim, acaba por remover proteínas descapacitantes provindas do plasma seminal (ALFRADIQUE *et al.*, 2019). De acordo com o presente estudo, observamos que os espermatozoides provindos diretamente do congelamento e que passaram pelo processo de Mini-Percoll já mostravam certo grau de capacitação *espontânea* (37%), isto antes mesmo da indução *in vitro* com heparina, agente capacitante (Tabela 1), em porcentagem semelhante à encontrada por Alfradique *et al.* (2019) e menor que a encontrada em um estudo prévio de nosso laboratório (SANGUINET, 2020). O presente trabalho não apresentou diferenças significativas entre as taxas de capacitação espermática comparando as diferentes etapas de avaliações. A taxa de espermatozoides capacitados após a indução com heparina foi menor que a descrita por ASSUMPÇÃO *et al.* (2002) e em trabalho anterior de nosso laboratório (SANGUINET, 2020).

A capacitação e a reação acrossômica *in vitro* podem induzidas por meio de diferentes tratamentos (GRAHAM, 1996, BIRD *et al.*, 1989). Após a capacitação, um sinal primário que determina o início da reação acrossômica é uma alteração na permeabilidade da membrana plasmática dos espermatozoides ao cálcio. Levando em consideração esta observação o uso de ionóforos de cátions divalentes, como o A23187, são utilizados para induzir artificialmente a entrada de cálcio nos espermatozoides, resultando na reação acrossômica em espermatozoides bovinos (TRIANA *et al.*, 1980). Espermatozoides com reação acrossomal induzida já foram

utilizados em ensaios de penetração de oócitos sem zona pelúcida (YANAGIMACHI, 1981, GRAHAM, 1996, GRAHAM; FOOTE; HOUGH, 1987, LANDIM-ALVARENGA *et al.*, 2001), a qual é uma ferramenta valiosa na avaliação de espermatozoides capacitados e reagidos *in vitro*. A taxa de penetração espermática depende da concentração do cálcio ionóforo, uma vez que pode influenciar em uma maior ou menor taxa de espermatozoides reagidos (GRAHAM, 1996, GRAHAM; FOOTE; HOUGH, 1987).

Neste experimento as taxas de fecundação entre os oócitos com e sem zona pelúcida não diferiram, assim como não diferiram das taxas de ativação dos partenotos do grupo controle. Apesar disto, as taxas de fecundação se encontraram abaixo do esperado segundo a literatura, (80%; de acordo com o revisado por LONERGAN; FAIR, 2016). A taxa de ativação partenogenética esteve de acordo com resultados obtidos por Wang *et al* (2008) e Meo *et al* (2007) utilizando apenas ionomicina. A média de maturação oocitária neste experimento também foi baixa (64%) se considerarmos a taxa de 90% que seria esperada (revisado por LONERGAN; FAIR, 2016). No entanto, trabalhos anteriores de clonagem realizados em nosso laboratório obtiveram taxas semelhantes de maturação que resultaram em ativação e clivagem normais no grupo controle de partenotos, sugerindo que a maturação dos oócitos não foi o limitante para o desenvolvimento dos zigotos neste experimento (GERGER *et al.*, 2010; RIBEIRO *et al.*, 2009; FORELL *et al.*, 2008). Em adição, a avaliação realizada 18 a 20 h após o início da MIV também tende a resultar em uma taxa menor de maturação do que se realizada com 24 h. É possível então que a taxa de fecundação não tenha chegado no esperado pela menor taxa de capacitação espermática, como já descrito.

Ao contrário do relatado por HANADA e CHANG (1976) se observou uma maior taxa de fecundação polispérmica nos oócitos intactos, contrariando a observação de que a zona pelúcida é a maior barreira do oócito contra a polispermia (Tabela 3). A polispermia deveria, portanto, aparecer em maiores taxas nos oócitos submetidos ao procedimento de FIV sem zona pelúcida, e não no grupo de FIV convencional. Na FIV de algumas espécies, como nos suínos, o fenômeno da polispermia é comum, constituindo um dos principais problemas na implementação desta biotécnica na espécie (SJUNNESSON, 2020). Também se sabe que quando a zona pelúcida é removida, a especificidade à fecundação é reduzida (YANAGIMACHI, 1981), como mencionado acima, o que permite que os espermatozoides entrem em grande quantidade no citoplasma do oócito (HANADA; CHANG, 1976).

Uma possível explicação para este resultado incomum seria a ação da protease, enzima utilizada para a remoção da ZP, sobre proteínas de adesão e fusão dos espermatozoides presentes na membrana do oócito (HANADA; CHANG, 1972). Outra possibilidade se baseia no observado por Bianchi *et al.* (2014), que demonstraram que a proteína de ligação oocitária JUNO é rapidamente translocada da superfície da membrana para vesículas no espaço perivitelínico após a fecundação, neutralizando as proteínas de ligação da membrana espermática e impedindo a ligação dos gametas masculinos ao oolema, constituindo uma forma de bloqueio à polispermia. A alta taxa de fecundação polispérmica nos oócitos com zona pelúcida ainda precisa ser melhor investigada, mas pode estar relacionada à maturação citoplasmática ineficiente, resultando em incompetência na liberação dos grânulos corticais (GONÇALVES; FIGUEIREDO; FREITAS, 2008).

Também supomos que a indução *in vitro* da reação acrossômica pode não conferir eventos fisiológicos que permitam a translocação adequada das proteínas na superfície do espermatozoide, fundamentais para adesão e fusão com o gameta feminino, localizadas na zona equatorial espermática (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), mecanismo proposto por Austin e Braden em 1956 e validado por Barros e Yanagimachi (1971) como adicional ao processo de bloqueio à polispermia.

7 CONCLUSÕES

- a) O modelo de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos sem zona pelúcida utilizando espermatozoides bovinos de sêmen congelado após indução *in vitro* da capacitação e da reação acrossômica permitiu a fecundação monospérmica de oócitos, com baixas taxas de polispermia.
- b) Ainda são necessários ajustes nos protocolos de indução da capacitação e da reação acrossômica *in vitro*.
- c) As taxas semelhantes de fecundação *in vitro* de oócitos bovinos com e sem zona pelúcida demonstram que o modelo de FIV bovina sem zona é um modelo promissor para a aplicação em estudos que acercam a fecundação e desenvolvimento embrionário em diferentes espécies mamíferas.

REFERÊNCIAS

- ALFRADIQUE, V A P; OLIVARES, C C S O; SOUZA-FABJAIN, J M G; FONSECA, J F F; BATISTA, R I T P; BALARO, M F A; SARAIVA, H F R; CÔRTEZ, L R; BRANDÃO F Z. Mini-Percoll technique induces similar capacitation features in domestic ruminant frozen-thawed spermatozoa regardless of the presence of heparin. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 47, n. 1707, p. 1-8, dez. 2019.
- 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.
- 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.
- 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.; YANAGIMACHI, R. Induction of Zona Reaction in Golden Hamster Eggs by Cortical Granule Material. **Nature**, v. 233, p. 268-269, 1971.
- BAVISTER B.D. Early history of in vitro fertilization. **Reproduction**. v. 124, n. 2, p. 181-196, 2002.

- BERGER, T. Zona pellucida-induced acrosome reaction in boar sperm. **Biology of Reproduction**, v. 40, n. 3, p. 525-530, 1989.
- 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.
- BÉZARD, J.; MAGISTRINI, M.; DUCHAMP, G.; PALMER, E. La fecondation in-vitro chez les équides. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v. 168, n. 11-12, 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, 2014.
- BIANCHI, E.; WRIGHT, G. J. Izumo meets Juno: preventing polyspermy in fertilization. **Cell Cycle**, v. 13, n. 13, p. 2019-2020, 2014.
- BIGGERS, J. D. IVF and embryo transfer: historical origin and development. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 25, n. 2, p. 118-127, 2012.
- BIRD, J.M.; CAREY, S.; HOUGHTON, J.A. Motility and acrosomal changes in ionophore-treated bovine spermatozoa and their relationship with in vitro penetration of zone-free hamster oocytes. **Theriogenology**, v. 32, n. 2, p. 227-242, 1989.
- BLONDIN, P. Logistics of large scale commercial IVF embryo production. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 29 n. 1, p. 32-36, 2017.
- 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.
- 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.
- BREVINI, T. A. L.; GANDOLFI, F. Parthenotes as a source of embryonic stem cells. **Cell Proliferation**, v. 41, p. 20-30, 2008.
- 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.

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.

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.

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.

FAUSER, B. C.; EDWARDS, R. G. The early days of IVF. **Human Reproduction Update**, v. 11, n. 5, p. 437-438, 2005.

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.

FORELL, F., FELTRIN, C., DOS SANTOS, L. C., DA COSTA, U. M., VIEIRA, A. D., HOELKER, M., RODRIGUES, J. L. Use of bovine oocytes as recipient cytoplasm in the production of embryos through nuclear transfer of interspecies somatic cells (NTSCi). **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 36, n. 2, p. 141-147, 2008.

GAO, D; MAZUR, P; CRITSER, J.K. Fundamental cryobiology of mammalian spermatozoa. In: **Reproductive Tissue Banking**. Academic Press, 1997. p. 263-328.

GERGER, R.P.C.; RIBEIRO E.S.; FORELL, F.; BERTOLINI, L.R.; RODRIGUES, J.L.; AMBRÓSIO, C.E.; M.A. MIGLINO, M.A.; MEZZALIRA, A.; BERTOLINI, M. *In vitro* development of cloned bovine embryos produced by handmade cloning using somatic cells from distinct levels of cell culture confluence. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 1, p. 295-302, 2010.

GONÇALVES, P. B. D.; OLIVEIRA, M. A. L. de; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M. M.; VISINTIN, J. A.; COSTA, L. F. S. da. Produção *In Vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R. de; FREITAS, V. J. de F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap. 14, p. 408.

- 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.
- 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.
- GRAHAM, J.K.; FOOTE, R.H.; HOUGH, S.R. Penetration of zona-free hamster eggs by liposome-treated sperm from the bull, ram, stallion, and boar. **Biology of Reproduction**, v. 37, n. 1, p. 181-188, 1987.
- 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.
- 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.
- HOODBHOY, T.; TALBOT, P. Mammalian cortical granules: contents, fate, and function. **Molecular Reproduction and Development**, v. 39, n. 4, p. 439-448, 1994.
- HUNTER, P. The long-term health risks of ART: Epidemiological data and research on animals indicate that in vitro fertilization might create health problems later in life. **EMBO Reports**, v. 18 n.7 p. 1061-1064, 2017.
- HYTTEL, P. F. T. C. H.; FAIR, T.; CALLESEN, H.; & GREVE, T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.
- 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.
- JÉGOU, A.; ZIYYAT, A.; BARRAUD-LANGE, V.; PEREZ, E.; WOLF, J. P.; PINCET, F.; GOURIER, C. CD9 tetraspanin generates fusion competent sites on the egg membrane for

mammalian fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 27, p. 10946-10951, 2011.

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.

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.

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.; 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.

LEESE, H. J. The formation and function of oviduct fluid. **Reproduction**, v. 82, n. 2, p. 843-856, 1988.

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.

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.

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.

MARTINS, C. F.; DODE, M. A. N.; SILVA, A. E. D. F. Atlas de morfologia espermática bovina. Brasília, DF. Embrapa, 2015 p. 100.

McGRATH, J.; SOLTER, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. **Cell**, v. 37, n. 1, p. 179-183, 1984.

McINTYRE, J.A.; GILULA, N.B.; KARNOVSKY, M.J. Cryoprotectant-induced redistribution of intramembranous particles in mouse lymphocytes. **The Journal of Cell Biology**, v. 60, n. 1, p. 192-203, 1974.

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.

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.

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, 2009.

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.

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.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.
- 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.
- PESSOA, G. A. **Separação espermática pré refrigeração do sêmen equino**. Tese (Doutorado em Medicina Animal) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2016. 100 p.
- RIBEIRO, E.S.; GERGER, R. P.C.; OHLWEILER, L. U., ORTIGARI, J. I.; MEZZALIRA, J. C., FORELL, F., BERTOLINI, L.R.; RODRIGUES, J.L.; AMBRÓSIO C.E.; MIGLINO, M.A.; MEZZALIRA, A.; BERTOLINI, M. Developmental potential of bovine hand-made clone embryos reconstructed by aggregation or fusion with distinct cytoplasmic volumes. **Cloning and Stem Cells**, v. 11, n. 3, p. 377-386, 2009.
- 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.
- RICKER, J.V.; LINFOR, J.J.; DELFINO, W.J.; KYSAR, P.; SCHOLTZ, E.L.; TABLIN, F.; MEYERS, S.A. Equine sperm membrane phase behavior: the effects of lipid-based cryoprotectants. **Biology of Reproduction**, v. 74, n. 2, p. 359-365, 2006.
- 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.
- SANGUINET, E. O. **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**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2020. 117 p.
- 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.
- SATOUH, Y.; IKAWA, M. New insights into the molecular events of mammalian fertilization. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 10, p. 818-828, 2018.
- 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.
- SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; BLONDIN, P.; ROBERT, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 36, n. 1, p. 126-136, 2006.
- SJUNNESSON, Y. *In vitro* fertilisation in domestic mammals—a brief overview. **Upsala Journal of Medical Sciences**, p. 1-9, 2020.
- STEPTOE, P. C.; EDWARDS, R. G. Birth after the reimplantation of human embryo. **Lancet**, v.2, n. 8085, n.366, 1978.
- STOJKOVIC, M.; MACHADO, S.A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P.B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of Reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001.
- STOREY, K. B.; STOREY, J. M. Molecular physiology of freeze tolerance in vertebrates. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 2, p. 623-665, 2017.
- SUAREZ, S. S.; PACEY, A. A. Sperm transport in the female reproductive tract. **Human Reproduction Update**, v. 12, n. 1, p. 23-37, 2006.

- SURANI, M. A. H.; BARTON, S. C; NORRIS, M. L. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. **Nature**, v. 308, n. 5959, p. 548-550, 1984.
- TOYODA, Y.; CHANG, M. C. Fertilization of rat eggs in vitro by epididymal spermatozoa and the development of eggs following transfer. **Reproduction**, v.36, n. 1, p. 9-22, 1974.
- 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.
- 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. 2019 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. **Embryo Technology Newsletter**, v. 38, n. 4, p. 1-15, 2020.
- VISCONTI, P. E.; KRAPP, 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, 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, 292-301, 2008.
- WHITTINGHAM, D.G. Fertilization of mouse eggs in vitro. **Nature**, v. 220, n. 5167, p. 592-593, 1968.
- 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.