

UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS REALEZA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM SAÚDE, BEM-ESTAR E PRODUÇÃO
ANIMAL SUSTENTÁVEL DA FRONTEIRA SUL

MATHEUS RAMOS ROSIN

SÊMEN CRIOPRESERVADO COM EXTRATO DA CASCA DE NOZ PECÃ PODE
ALTERAR A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS?

REALEZA

2026

MATHEUS RAMOS ROSIN

**SÊMEN CRIOPRESERVADO COM EXTRATO DA CASCA DE NOZ PECÃ PODE
ALTERAR A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável, da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção de título de mestre em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável, da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientadora: Profa. Dra. Adalgiza Pinto Neto

REALEZA

2026

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Rosin, Matheus Ramos

SÊMEN CRIOPRESERVADO COM EXTRATO DA CASCA DE NOZ PECÃ
PODE ALTERAR A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS? /
Matheus Ramos Rosin. -- 2026.

56 f.:il.

Orientadora: Dra Adalgiza Pinto Neto

Co-orientador: Dr Joaquim Mansano Garcia

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Bacharelado em Medicina Veterinária,
Realeza,PR, 2026.

1. Antioxidante. 2. Sêmen. 3. Oócito. 4. Clivagem. 5.
FIV. I. Pinto Neto, Adalgiza, orient. II. Garcia,
Joaquim Mansano, co-orient. III. Universidade Federal da
Fronteira Sul. IV. Título.

Elaborada pelo sistema de Geração Automática de Ficha de Identificação da Obra pela UFFS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MATHEUS RAMOS ROSIN

**SÊMEN CRIOPRESERVADO COM EXTRATO DA CASCA DE NOZ PECÃ PODE
ALTERAR A PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS?**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável, da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), como requisito para obtenção de título de mestre em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável, da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Este trabalho foi defendido e aprovado pela banca em 16/04/26.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Adalgiza Pinto Neto – UFFS
Orientadora

Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia
Pesquisador Sênior – UFFS
Co-orientador

Profa. Dra. Dalila Moter Benvegnú – UFFS
Avaliador

Profa. Dra. Rosiara Rosária Dias Maziero Guaitolini – UNIVEL
Avaliador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me conceder saúde, força e perseverança durante toda a caminhada acadêmica, permitindo que eu superasse cada desafio encontrado ao longo desta trajetória;

À minha família, especialmente aos meus pais e ao meu irmão, por todo amor, apoio, incentivo e pelos inúmeros esforços realizados para que eu pudesse alcançar mais essa conquista. Sem vocês, nada disso seria possível;

À minha noiva, pelo companheirismo, paciência, compreensão e apoio incondicional nos momentos mais difíceis. Obrigado por estar ao meu lado durante toda essa jornada, compartilhando sonhos, angústias e conquistas;

À minha orientadora, Profa. Dra. Adalgiza Pinto Neto, pela orientação, confiança, dedicação e pelos ensinamentos transmitidos durante o desenvolvimento deste trabalho e da minha formação acadêmica;

Ao Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia, pela coorientação, contribuições científicas e disponibilidade em auxiliar no desenvolvimento desta pesquisa;

À Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Campus Realeza, e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável, pela oportunidade de realização do mestrado e pelo suporte oferecido durante esse período.

Ao Laboratório de Reprodução Animal (LABRA) e ao Laboratório parceiro Sêminna®, por toda estrutura disponibilizada, apoio técnico e auxílio durante a execução experimental desta pesquisa, e

À todos os colegas, professores, técnicos e amigos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

A minha noiva meu irmão e meus pais, que
não pouparam esforços para que eu pudesse
conquistar esse título acadêmico tão
importante!

Dedico.

RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma importante biotecnologia aplicada à reprodução bovina, ao promover maior ganho genético dos rebanhos. Na fertilização *in vitro* (FIV), o sêmen exerce papel fundamental e pode ser comprometido pela criopreservação, devido ao aumento do estresse oxidativo e aos danos celulares nos espermatozoides. Nesse contexto, antioxidantes naturais têm sido investigados como estratégia para preservar a funcionalidade espermática e melhorar o desenvolvimento embrionário. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos da adição de diferentes concentrações do extrato natural da casca da noz pecã, com potencial antioxidante (NP), ao sêmen bovino utilizado na FIV. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4×2 , composto por quatro concentrações de extrato natural adicionadas ao sêmen criopreservado (0%; 0,5%; 0,75% e 1%) e dois meios de cultivo embrionário (base e comercial). Foram realizadas oito coletas de oócitos provenientes de ovários de abatedouro, totalizando 2.191 complexos cumulus oócito (COCs), classificados em GI (17,7%), GII (27,0%) e GIII (55,3%). Em cada coleta, os COCs foram distribuídos em dois momentos experimentais (M1 e M2) e submetidos às etapas de maturação (MIV), fertilização e cultivo *in vitro* (CIV). Os COCs do M1 foram utilizados para avaliação da fecundação 16 horas após a FIV, por meio da análise da formação de pró-núcleos, enquanto os do M2 permaneceram em cultivo embrionário até 168 horas pós FIV para avaliação do desenvolvimento embrionário. A taxa de formação de pró-núcleos variou entre 85,1% e 87,7%, sem efeito significativo das concentrações do extrato natural ou dos meios de cultivo ($p > 0,05$). Entretanto, observou-se redução significativa na taxa de clivagem e na produção de blastocistos com o aumento da concentração de NP, sendo que as taxas de clivagem foram de 80,6%, 76,6%, 70,0% e 56,9% para os grupos controle, 0,5%, 0,75% e 1% de NP, respectivamente ($p < 0,0001$), e a produção de blastocistos reduzida de 44,8% no grupo controle para 30,7%, 25,6% e 14,5% nos grupos suplementados com 0,5%, 0,75% e 1% de NP ($p < 0,0001$). Não houve diferença entre os meios de cultivo ($p > 0,05$), para a taxa média de clivagem (69,0% no meio base e 73,0% no meio comercial), e produção embrionária de 27,3% e 30,5%, no meio base e comercial, respectivamente. Conclui-se que a adição do NP ao sêmen bovino não interferiu nos eventos iniciais da fecundação, porém ao se aumentar a concentração, especialmente a de 1%, houve comprometimento significativo do desenvolvimento embrionário, redução das taxas de clivagem e de produção de blastocistos.

Palavras-chave: antioxidante; sêmen; oócito; clivagem; FIV

ABSTRACT

In Vitro Embryo Production (IVEP) is an important biotechnology applied to bovine reproduction, promoting greater genetic gain in cattle herds. In vitro fertilization (IVF) relies heavily on semen quality, which may be compromised by cryopreservation due to increased oxidative stress and cellular damage to spermatozoa. In this context, natural antioxidants have been investigated as a strategy to preserve sperm functionality and improve embryonic development. Therefore, the present study aimed to evaluate the effects of adding different concentrations of a natural pecan nutshell extract with antioxidant potential (NP) to bovine semen used for IVF. A completely randomized experimental design was adopted in a 4×2 factorial arrangement, consisting of four concentrations of natural extract added to cryopreserved semen (0%, 0.5%, 0.75%, and 1.0%) and two embryo culture media (basal and commercial). Eight oocyte collections were performed from slaughterhouse-derived ovaries, totaling 2,191 cumulus–oocyte complexes (COCs), classified as Grade I (17.7%), Grade II (27.0%), and Grade III (55.3%). In each collection, COCs were allocated into two experimental groups (M1 and M2) and subjected to in vitro maturation (IVM), fertilization, and embryo culture procedures. COCs from M1 were used to assess fertilization 16 hours after IVF through pronuclear formation analysis, whereas COCs from M2 remained in embryo culture until 168 hours post-IVF for evaluation of embryonic development. The pronuclear formation rate ranged from 85.1% to 87.7%, with no significant effect of either NP concentration or culture medium ($p > 0.05$). However, a significant reduction in cleavage rate and blastocyst production was observed as NP concentration increased. Cleavage rates were 80.6%, 76.6%, 70.0%, and 56.9% for the control, 0.5%, 0.75%, and 1.0% NP groups, respectively ($p < 0.0001$). Likewise, blastocyst production decreased from 44.8% in the control group to 30.7%, 25.6%, and 14.5% in the groups supplemented with 0.5%, 0.75%, and 1.0% NP, respectively ($p < 0.0001$). No differences were detected between embryo culture media ($p > 0.05$), with average cleavage rates of 69.0% and 73.0% and embryo production rates of 27.3% and 30.5% for the basal and commercial media, respectively. In conclusion, supplementation of bovine semen with NP did not affect the initial events of fertilization. However, increasing NP concentrations, particularly at 1.0%, significantly impaired embryonic development, resulting in reduced cleavage rates and lower blastocyst production.

Keywords: antioxidant; semen; oocyte; cleavage; IVF.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: COCs aspirados de ovários de fêmeas bovinas de abatedouros, selecionados e classificados como Grau I, II e III.	33
Figura 2: Estruturas avaliadas 16 HPF (horas após FIV) contendo dois, um e nenhum pronúcleo respectivamente, coradas com Hoechst 33342/DAPI.	37
Figura 3: Estruturas embrionárias observadas após início da divisão celular (2, 4 e 8 células), clivadas 48 HPF e embriões avaliados 168 HPV, fixados em paraformaldeído.	39
Figura 4: Blastocistos formados após 168 HPF, submetidos a técnica de coloração Hoechst 33342/DAPI.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Quantidade de COCs de ovários de fêmeas bovinas de abatedouros, selecionados e classificados como Grau I, II e III.	33
Tabela 2: Quantidade de oócitos, taxas de clivagem e produção embrionária obtidas nos meios de cultivo Base e BioKlone® durante a PIVE.	35
Tabela 3: Porcentagem de zigotos formados 16 HPF (horas após FIV) considerando dois meios de cultivo e diferentes concentrações de extrato natural (NP) utilizado no sêmen.	36
Tabela 4: Porcentagem de embriões clivados e de embriões formados considerando a porcentagem de extrato natural com potencial antioxidante adicionado no meio diluidor do sêmen utilizado na FIV.....	38
Tabela 5: Porcentagem de embriões clivados e de embriões formados considerando o meio utilizado na FIV, sem diferença significativa entre os meios.....	40
Tabela 6: Número de células de blastocisto 168 HPF de acordo com o meio de cultivo utilizado na PIVE.	42
Tabela 7: Número de células de blastocisto de acordo com a concentração de NP no sêmen utilizado na PIVE.	42

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	FISIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN BOVINO.....	14
2.2	UTILIZAÇÃO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO NA PIVE	15
2.3	MATURAÇÃO OOCITÁRIA E ATIVAÇÃO CELULAR NA PIVE BOVINA .	19
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	GERAL.....	24
3.2	ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	25
4.1	EXTRAÇÃO DO EXTRATO NATURAL (NP) E CONGELAÇÃO DO SÊMEN	25
4.2	COLETA, AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DOS COCS	26
4.3	MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i> (MIV)	27
4.4	FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV).....	27
4.4.1	Avaliação da formação de pro-núcleos com 16 horas após FIV	29
4.5	CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV)	29
4.5.1	Contagem de estruturas clivadas (48 HPF) e blastocistos (168 HPF)	30
4.5.2	Preparo e utilização do corante Hoechst 33342.....	30
4.5.3	Coloração Nuclear para avaliação da formação dos pro-núcleos e contagem do número de células nos embriões 168 HPF	31
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6	CONCLUSÃO	44
7	REFERÊNCIAS	45
	ANEXO I	52

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) consolidou-se como uma das principais biotecnologias aplicadas ao melhoramento genético bovino, permitindo a obtenção de embriões em ambiente laboratorial a partir de gametas de elevado valor genético. No cenário mundial, o Brasil destaca-se com grande avanço na PIVE, evidenciando a expansão e a importância estratégica da técnica para sistemas de produção de bovinos de corte e leite (Viana et al., 2018; Monteiro et al., 2020; Khan et al., 2021). Além de ampliar a disseminação de material genético superior, a PIVE possibilita a otimização do uso do sêmen, permitindo a produção de múltiplos embriões a partir de uma única palheta e o emprego de diferentes reprodutores para uma mesma doadora (Viana et al., 2018).

Dentro desse contexto, a qualidade do sêmen constitui um dos principais determinantes do sucesso da fertilização *in vitro* (FIV) e, consequentemente, da eficiência da PIVE. A integridade estrutural e funcional dos espermatozoides influencia diretamente os eventos essenciais da fecundação, como capacitação espermática, reação acrossômica, fusão com o oócito, ativação oocitária e formação adequada dos pronúcleos, refletindo na taxa de clivagem e no desenvolvimento até blastocisto (Castiglioni et al., 2021; Amaral et al., 2022). Assim, alterações na membrana plasmática, na atividade mitocondrial ou na integridade do DNA dos espermatozoides podem comprometer a competência fecundante e limitar o potencial embrionário (Castiglioni et al., 2021).

A criopreservação seminal, embora fundamental para viabilizar o armazenamento e a difusão do material genético, está associada a importantes alterações celulares. Durante os processos de refrigeração, congelamento e descongelamento, ocorrem modificações na fluidez da membrana, danos mitocondriais e fragmentação do DNA espermático, frequentemente relacionados ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Aitken; Drevet, 2020; Silva, et al., 2020). O desequilíbrio redox pós-descongelamento pode comprometer a fertilização *in vitro* e reduzir as taxas de clivagem e formação de blastocistos, impactando diretamente os resultados da PIVE (Yáñez-Ortiz et al., 2021; De Oliveira et al., 2023).

Durante as etapas da PIVE, outros fatores também contribuem para o aumento do estresse oxidativo, como elevada tensão de oxigênio, variações de temperatura e exposição à luz. Estudos demonstraram que o controle rigoroso das condições de cultivo, especialmente a redução da concentração de oxigênio, favorece a manutenção do equilíbrio redox e melhora a qualidade embrionária em bovinos (Soto-Heras; Paramio, 2020). Embora as células gaméticas

possuam sistemas antioxidantes endógenos, incluindo superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX), esses mecanismos podem ser insuficientes frente ao estresse oxidativo imposto pelas condições *in vitro* (Aitken; Drevet, 2020; Keane; Ealy, 2024).

Nesse cenário, a suplementação antioxidante surgiu como estratégia promissora para minimizar os efeitos deletérios das EROs. A adição de antioxidantes aos diluentes seminais e aos meios de cultivo *in vitro* (CIV) visa preservar a integridade das membranas, proteger o DNA espermático e estabilizar a função mitocondrial, promovendo maior viabilidade celular durante a fertilização e o cultivo embrionário *in vitro* (Yáñez-Ortiz et al., 2021; Ribeiro et al., 2022; De Oliveira et al., 2023). Compostos bioativos de origem vegetal, presentes em extratos naturais, apresentam propriedades antioxidantes capazes de neutralizar EROs e reduzir a peroxidação lipídica, configurando alternativa complementar às abordagens convencionais (Guemra et al., 2013; Soto-Heras; Paramio, 2020).

A exemplo de bioativos em extratos naturais, a *Carya illinoensis* (nogueira-pecã) destaca-se pelo elevado conteúdo de ácidos graxos monoinsaturados presentes nas nozes e na casca, além de expressivo potencial antioxidante associado à elevada concentração de compostos fenólicos, flavonoides e taninos condensados (Vieira et al., 2020). Estudos fitoquímicos demonstraram que subprodutos da noz-pecã, especialmente na casca, apresentaram atividade antioxidante superior à do fruto, em função da maior densidade de polifenóis totais, capazes de atuar na neutralização de EROs e na inibição da peroxidação lipídica (amaral et al 2019; Cason et al., 2021; Villasante et al., 2022).

A aplicação biológica do extrato aquoso da casca de noz-pecã tem sido investigada por Benvegnú et al. (2010), ao demonstrarem efeito citoprotetor significativo em ratos submetidos a protocolos quimioterápicos, reduzindo marcadores de estresse oxidativo sistêmico e danos celulares induzidos por EROs. Estudos posteriores reforçaram esses achados, indicando que os efeitos antioxidantes do extrato estão diretamente relacionados à sua composição fenólica, com destaque para o ácido gálico como um dos principais metabólitos bioativos (Benvegnú et al., 2013; Hilbig et al., 2018; Vieira et al., 2020).

No estudo realizado por Vieira et al. (2020), foi demonstrado que a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos totais, incluindo o ácido gálico, são diretamente influenciados pelas condições de extração, especialmente pelo pH e pelo uso de enzimas. Os autores observaram que o maior rendimento de compostos fenólicos ocorreu em pH 6,0, evidenciando que pequenas variações nas condições do processo podem alterar significativamente a composição do extrato obtido. Esse achado é particularmente relevante,

pois indica que o extrato natural não apresenta composição fixa, podendo conter diferentes concentrações e combinações de moléculas bioativas, dependendo do método empregado.

Nesse contexto, o ácido gálico (GA - ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico) é um polifenol amplamente distribuído em matrizes vegetais, como sementes de uva, morangos, romã, chá verde, nozes e leguminosas, sendo reconhecido por sua elevada capacidade de sequestro de EROs (De La Rosa et al., 2014). Além de sua ação antioxidante, o GA apresenta propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirais e anti-inflamatórias, o que amplia seu interesse em aplicações biomédicas e biotecnológicas (Do Prado et al., 2014).

Do ponto de vista funcional, a atividade biológica do GA está relacionada à presença de múltiplos grupamentos hidroxila em sua estrutura química, que favorecem a doação de elétrons e hidrogênios, estabilizando EROs e interrompendo reações em cadeia de oxidação. Adicionalmente, a formação de ésteres derivados do GA potencializa sua capacidade de atravessar membranas biológicas e de proteger lipídios, proteínas e ácidos nucleicos contra danos oxidativos (Badhani; Sharma; Kakkar, 2015). Por essas características, o extrato da casca de noz pecã ricos em GA tem sido amplamente explorado como componente funcional em formulações farmacêuticas, nutraceuticas e, mais recentemente, como antioxidante natural promissor em sistemas biológicos sensíveis ao estresse oxidativo, incluindo células germinativas e processos de criopreservação.

Paralelamente, o avanço das técnicas de avaliação seminal, como o CASA (Computer Assisted Sperm Analysis), permitiu maior precisão na análise da motilidade, cinética e concentração espermática, contribuindo para a padronização dos estudos que avaliam o impacto de antioxidantes sobre a qualidade seminal (Amann; Waberski, 2014). Essas ferramentas são fundamentais para correlacionar parâmetros espermáticos com os resultados obtidos na FIV e no desenvolvimento embrionário.

Considerando a relevância do equilíbrio redox para a funcionalidade espermática e para o sucesso da PIVE, a avaliação da adição de antioxidantes ao sêmen apresenta elevada importância científica e aplicada, objetiva-se com esse estudo, avaliar a PIVE em bovinos utilizando sêmen acrescido de diferentes concentrações de um extrato da casca de noz pecã (NP), em dois diferentes meios de cultivo, investigando seus efeitos sobre a fertilização *in vitro*, taxa de clivagem, desenvolvimento embrionário e contagem de células embrionárias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 FISIOLOGIA E CARACTERÍSTICAS DO SÊMEN BOVINO

O sêmen bovino consiste em um fluido biológico altamente especializado, composto por células gaméticas masculinas (espermatozoides) suspensos em meio líquido (plasma seminal), que mantém a viabilidade e funcionalidade espermática, atuando na proteção contra variações osmóticas, no fornecimento de substratos energéticos, na modulação do ambiente e na regulação dos eventos fisiológicos envolvidos na capacitação espermática e no transporte dos gametas até o local de fertilização no trato reprodutivo da fêmea (Amann; Waberski, 2014; Torralvo et al., 2025).

Em bovinos púberes, o ejaculado caracteriza-se por apresentar volume variando, em média, entre 5 e 8 mL, e concentração espermática elevada, frequentemente superior a 800 milhões de espermatozoides por mL, resultando em ejaculados que podem conter bilhões de células espermáticas (Amann; Waberski, 2014). Essa elevada concentração constitui uma característica de grande relevância zootécnica, pois favorece a ampla utilização do sêmen bovino em protocolos de diluição, criopreservação, inseminação artificial e PIVE, permitindo a produção de grande número de doses inseminantes por ejaculado, sem prejuízo à eficiência reprodutiva (Watson, 2000).

O sêmen bovino apresenta ainda particularidades fisiológicas que conferem maior resistência aos processos de criopreservação quando comparado a outras espécies, como os equinos (Emerick et al., 2011). Em condições normais, os espermatozoides bovinos apresentam motilidade progressiva superior a 60–70% e pH seminal neutro a levemente alcalino. Em contraste, quando se trata de composição lipídica da membrana plasmática, é caracterizada por teor de ácidos graxos poli-insaturados, que aumentam a susceptibilidade ao estresse oxidativo e ao choque térmico durante a descongelação (Emerick et al., 2011; Aitken; Drevet, 2020).

Os espermatozoides dos mamíferos possuem uma organização estrutural bem delimitada, composta essencialmente pela cabeça e cauda, sendo a última subdividida em peça intermediária e flagelo (John et al., 2007; Torralvo et al., 2025). A cabeça do espermatozoide bovino apresenta formato oval e achatado, aonde encontra-se o núcleo celular, que contém o ácido desoxirribonucleico (DNA) altamente compactado, devido à associação do DNA com proteínas básicas específicas, denominadas protaminas espermáticas, formando uma cromatina altamente condensada, condição essencial para a proteção do material genético durante o

transporte e para o adequado desenvolvimento embrionário pós-fertilização (Simões et al., 2014).

A correta organização da cromatina espermática está diretamente relacionada à fertilidade, influenciando a taxa de concepção, o desenvolvimento embrionário inicial e a eficiência das biotecnologias reprodutivas, como a inseminação artificial e a PIVE (Simões et al., 2014; Aitken; Drevet, 2020). Alterações na compactação da cromatina podem comprometer a integridade do DNA espermático, refletindo negativamente na competência embrionária e na qualidade dos blastocistos produzidos *in vitro* (Simões et al., 2014).

A cauda do espermatozoide é uma estrutura altamente especializada para a motilidade e pode ser dividida funcionalmente em regiões distintas. A peça intermediária envolve o axonema central por meio de uma bainha helicoidal de mitocôndrias, responsáveis pela produção de adenosina trifosfato (ATP), fornecendo energia para o batimento flagelar e contribuindo para a estabilidade estrutural do flagelo (Díaz-Miranda et al., 2018). O flagelo é fundamental para a propulsão progressiva do gameta, sendo composto por uma bainha fibrosa externa que confere elasticidade e resistência mecânica, além de abrigar proteínas motoras, como a dineína, responsáveis pelo deslizamento microtubular e pelo movimento ondulatório característico do espermatozoide (John et al., 2007; Díaz-Miranda et al., 2018).

2.2 UTILIZAÇÃO DE SÊMEN CRIOPRESERVADO NA PIVE

A importância da qualidade do sêmen utilizado no processo comercial da PIVE é um aspecto de muita importância na viabilidade e sucesso da técnica. Existem apenas uma significativa diferença entre touros nas taxas de clivagem e de blastocistos viáveis no final da produção embrionária, mas também na taxa de gestação no processo final da PIVE (O'Callaghan et al., 2021).

A capacitação espermática e a reação acrossômica constituem eventos centrais para a fertilização em bovinos, representando uma sequência altamente coordenada de modificações fisiológicas, bioquímicas e moleculares que ocorrem após a ejaculação e que, *in vitro*, precisam ser cuidadosamente mimetizadas para garantir o sucesso da fertilização *in vitro* na PIVE (Signorelli; Diaz; Morales, 2012; Celeghini et al., 2023; Ferreira L. D. et al., 2023).

O espermatozoide ejaculado, embora morfológicamente completo, é funcionalmente incapaz de fertilizar o oócito, necessitando passar por um processo de maturação funcional denominado capacitação, que o torna competente para reconhecer a zona pelúcida, desenvolver

motilidade hiperativada e responder aos estímulos que desencadeiam a reação acrossômica (Parrish, 2014; Salvador; Nogueira; Salvador, 2019; Ferreira L. D. et al., 2023). Ickowicz et al. (2012) relataram que a capacitação ocorre em duas fases, sendo uma fase rápida, que envolve a ativação dos flagelos para um movimento vigoroso e assimétrico, e uma fase lenta, que inclui mudanças nos padrões de movimento dos espermatozoides, chamadas de hiperativação.

Em bovinos, a capacitação *in vitro* é induzida por meios de cultivo de fertilização *in vitro* contendo bicarbonato (HCO_3^-), cálcio (Ca^{2+}), albumina sérica bovina (BSA) e heparina (que atua como um análogo funcional dos glicosaminoglicanos presentes no trato reprodutivo feminino) (Parrish, 2014; Celeghini et al., 2023).

De modo geral, quando o sêmen bovino é submetido à criopreservação, independentemente do tipo de diluente empregado, ocorrem alterações estruturais e funcionais relevantes na membrana plasmática do espermatozoide, com impacto direto sobre a dinâmica das proteínas do plasma seminal e sobre o processo de capacitação *in vitro*. Durante as etapas de diluição, resfriamento e congelamento, as proteínas ligadoras de espermatozoides (Binder of Sperm Proteins – BSPs), originalmente adsorvidas à membrana plasmática após a ejaculação, passam a interagir com os componentes do diluente crioprotetor, o que resulta em remoção parcial, redistribuição ou alteração de sua afinidade pela membrana espermática. Esse fenômeno compromete o papel regulador das BSPs sobre o efluxo controlado de colesterol, favorecendo alterações precoces na composição lipídica da membrana, frequentemente descritas como capacitation-like changes induzidas pela criopreservação (Amann; Pickett, 1987; Cunha et al., 2019).

Além disso, a criopreservação impõe intenso estresse térmico, osmótico e oxidativo, promovendo reorganização da bicamada lipídica, transições de fase dos fosfolípidios e redistribuição do colesterol de membrana. Os crioprotetores presentes nos diluentes, sejam de origem animal ou vegetal, interagem com os lípidios de membrana, com o objetivo de estabilizar a célula durante a congelamento; contudo, essa estabilização modifica a fluidez basal da membrana após a descongelamento. Como consequência, os espermatozoides descongelados apresentam membrana plasmática estruturalmente diferente daquela observada no sêmen fresco, com alterações nos microdomínios lipídicos e na organização de proteínas associadas à sinalização e à fusogenicidade, fatores críticos para a progressão fisiológica da capacitação (Watson, 2000; Fleisch; Gadella, 2000; Silva; Gadella, 2006).

Após a descongelamento e incubação em meio de cultivo de fertilização *in vitro* (FIV), os espermatozoides criopreservados dependem fortemente da ação de componentes como

albumina, bicarbonato e cálcio para restaurar a fluidez de membrana e reestabelecer a sinalização intracelular típica da capacitação. Entretanto, devido às modificações induzidas previamente pela criopreservação, esse processo tende a ocorrer de forma mais acelerada e menos sincronizada quando comparado ao sêmen fresco, aumentando a susceptibilidade à capacitação prematura e à reação acrossômica antecipada (Liu; Foote; Brockett, 1998; Cunha et al., 2019).

Em nível molecular, o bicarbonato exerce papel central como sinalizador intracelular da capacitação *in vitro*, e não apenas como agente tamponante do meio. A entrada de HCO_3^- no espermatozoide ativa diretamente a Adenil ciclase solúvel (sAC/ADCY10), promovendo aumento das concentrações intracelulares de AMP cíclico (cAMP) e consequente ativação da proteína quinase A (PKA). A ativação da via cAMP/PKA desencadeia fosforilações iniciais em resíduos de serina e treonina e estimula vias secundárias envolvendo tirosino-quinases, como SRC e PI3K, culminando no aumento progressivo da fosforilação em tirosina de proteínas localizadas principalmente no flagelo e na região pós-acrossomal. Em sistemas de capacitação e FIV, a presença de bicarbonato é indispensável para a aquisição da motilidade hiperativada e da competência fertilizante, uma vez que o controle isolado do pH, na ausência de HCO_3^- , resulta em ativação incompleta dessas vias de sinalização (Esposito et al., 2004; Naz; Rajesh, 2004).

O aumento do pH intracelular, associado à entrada de bicarbonato, favorece a ativação de canais iônicos sensíveis ao pH e à voltagem, entre os quais se destaca o canal CatSper, considerado a principal via de entrada de Ca^{2+} no flagelo dos espermatozoides de mamíferos. A elevação do Ca^{2+} flagelar, em conjunto com a ativação de vias dependentes de PKA e CaMKII, promove a transição da motilidade progressiva para a motilidade hiperativada, caracterizada por batimentos assimétricos e de maior amplitude, essenciais para a penetração das camadas do cumulus oophorus e da zona pelúcida (Cruz et al., 2014; Bernhardt et al., 2018).

Após a capacitação *in vitro*, o espermatozoide bovino atinge um estado funcional altamente responsivo aos estímulos do sistema de fertilização *in vitro*, sem que ocorra prematuramente a reação acrossômica. Nesse estado, as proteínas envolvidas na exocitose acrossomal encontram-se organizadas entre a membrana plasmática do segmento apical e a membrana acrossomal externa, enquanto o remodelamento lipídico aumenta a fusogenicidade das membranas, mantendo, contudo, a integridade do acrossoma. A reação acrossômica permanece inibida até que o espermatozoide seja exposto a indutores adequados no ambiente *in vitro*, como componentes da zona pelúcida ou sinais do cumulus. Em contrapartida,

condições *in vitro* excessivamente intensas, como concentrações elevadas de heparina, tempo prolongado de incubação ou desequilíbrios redox, podem antecipar esse evento, comprometendo a viabilidade espermática e reduzindo a eficiência da fertilização *in vitro* (Ferreira W. et al., 2001; Gualtieri et al., 2021).

A reação acrossômica *in vitro* constitui o evento terminal da maturação *in vitro* (MIV) funcional do espermatozoide e corresponde a um processo de exocitose regulada altamente especializado, caracterizado por múltiplos pontos de fusão entre a membrana plasmática do segmento apical e a membrana acrossomal externa. Esse processo resulta na reorganização dessas membranas e na liberação controlada do conteúdo enzimático do acrossoma, incluindo proteases, como a acrosina, essenciais para a digestão localizada da zona pelúcida utilizada nos sistemas de fertilização *in vitro* (Parrish, 2014; Georgadaki et al., 2016).

O aumento abrupto e localizado da concentração intracelular de Ca^{2+} constitui o principal gatilho molecular da reação acrossômica, decorrente do influxo de Ca^{2+} por canais de membrana e da mobilização de estoques intracelulares localizados no acrossomo, sendo potencializado pela exposição a indutores específicos, como proteínas da zona pelúcida e progesterona adicionada ao meio de fertilização *in vitro*, com efeitos dependentes da concentração e das condições experimentais (Sengupta et al., 2024; Yang et al., 2024).

Após a fecundação, a formação dos pró-núcleos constitui um marco essencial da ativação oocitária zigoto. Esse processo inicia-se com a entrada do espermatozoide e a liberação da fosfolipase C zeta ($\text{PLC}\zeta$), que desencadeia oscilações de Ca^{2+} intracelular responsáveis pela inativação do MPF (fator promotor da maturação) e da via MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase), permitindo a conclusão da meiose II e a extrusão do segundo corpúsculo polar (Saunders et al., 2002). Em seguida, ocorre a descondensação da cromatina espermática, substituição das protaminas por histonas e formação do pró-núcleo masculino, enquanto o pró-núcleo feminino se organiza a partir do material genético materno remanescente. Tendo em vista que precisa existir uma sincronia entre esses eventos sendo fundamental para o desenvolvimento embrionário, prevenindo alterações na dinâmica de formação dos pró-núcleos, como a presença de apenas um pró-núcleo (1PN) ou ausência de pró-núcleos (0PN), os quais estão frequentemente associadas à ativação partenogenética, falhas na descondensação espermática ou assincronia na fusão dos genomas, resultando em menor competência embrionária e redução nas taxas de clivagem e formação de blastocistos (Walters et al., 2006)

2.3 MATURAÇÃO OOCITÁRIA E ATIVAÇÃO CELULAR NA PIVE BOVINA

Na PIVE em bovinos, a competência do oócito representa o principal determinante do sucesso da fecundação e do desenvolvimento embrionário inicial. Essa competência resulta da integração funcional entre maturação nuclear e maturação citoplasmática, processos rigidamente coordenados *in vivo*, mas que podem apresentar dissociação no ambiente *in vitro* (De Oliveira. F et al., 2025). A maturação nuclear corresponde à retomada da meiose a partir da prófase I, culminando na metáfase II (MII), enquanto a maturação citoplasmática envolve um conjunto complexo de eventos celulares indispensáveis para a aquisição da capacidade de ativação pós-fecundação e para o suporte do desenvolvimento embrionário precoce (Gottardi; Mingoti, 2009).

Do ponto de vista celular, a maturação citoplasmática compreende a redistribuição e reorganização funcional das mitocôndrias, assegurando adequada produção de ATP e controle do estado redox; a reorganização do retículo endoplasmático, essencial para a dinâmica dos estoques intracelulares de Ca^{2+} , processamento e estabilidade de RNAm e proteínas maternas, além da remodelação do citoesqueleto de actina e microtúbulos, fundamental para o posicionamento correto do fuso meiótico e para a extrusão do corpúsculo polar (Swann et al., 2006; Burla, 2017; Valencia et al., 2023). Esses eventos são fortemente dependentes da comunicação bidirecional entre o oócito e as células do cúmulus, mediada por junções comunicantes que permitem o trânsito de metabólitos, aminoácidos, nucleotídeos e segundos mensageiros, especialmente o AMPc (Burla 2017, Otero et al., 2017).

No nível molecular, a progressão meiótica é regulada principalmente pelo MPF, constituído pelo complexo CDK1–ciclina B. A ativação do MPF desencadeia a ruptura da vesícula germinativa (GVBD), sustenta a progressão até a metáfase I e mantém o oócito bloqueado em MII até que ocorra o estímulo de ativação proporcionado pela fecundação (Fan et al., 2009; Marques et al., 2011). A via MAPK/ERK1/2 (Mitogen-Activated Protein Kinase / Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2), ativada pela quinase codificada pelo proto-oncogene c-MOS, desempenha papel fundamental na organização e estabilidade do fuso meiótico, bem como na manutenção do bloqueio em MII. A inativação coordenada do MPF e da via MAPK. desencadeada pelo aumento transitório de Ca^{2+} intracelular após a fecundação, é indispensável para a retomada e conclusão da meiose, formação dos pró-núcleos e transição do oócito ao estado zigótico (He et al., 2021; Uzun et al., 2021).

Nos sistemas *in vitro*, alterações na tensão de oxigênio, osmolaridade, disponibilidade de fontes energéticas podem antecipar a ativação do MPF e acelerar a retomada meiótica sem que o oócito complete adequadamente seu preparo citoplasmático. Sendo frequentemente visto como uma aceleração da maturação *in vitro*, compromete a qualidade embrionária e reflete em menores taxas de clivagem, blastocistos de menor qualidade morfológica e alterações nos perfis de expressão gênica durante o período crítico da ativação do genoma embrionário (Dos Santos et al., 2002, Guevara et al., 2013).

Estratégias de modulação da maturação oocitária, como a elevação transitória dos níveis intracelulares de AMPc, têm sido exploradas com o objetivo de prolongar a comunicação *cumulus*–oócito e favorecer a sincronização entre maturação nuclear e citoplasmática. Estudos em bovinos demonstraram que protocolos bem delineados podem melhorar a competência embrionária e a qualidade de blastocistos, embora os efeitos foram dependentes do diâmetro oocitário, da qualidade do COCs e da duração do tratamento (Guevara et al., 2013; Burla; 2017).

Assim, a maturação oocitária na PIVE bovina deve ser compreendida como um processo altamente regulado, no qual eventos nucleares, citoplasmáticos e moleculares precisam ocorrer de forma harmoniosa. A simples obtenção de oócitos em MII não é indicativa de competência embrionária; o sucesso da PIVE depende fundamentalmente da preservação da fisiologia celular do oócito e da adequada mimetização *in vitro*, comprovadas pelas condições que sustentam a maturação funcional observada *in vivo* (Dos Santos et al., 2002).

1.1 PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E ANTIOXIDANTES

Os espermatozoides bovinos apresentam elevada susceptibilidade ao estresse oxidativo em função de suas características morfofuncionais altamente especializadas. Esses gametas possuem reduzido volume citoplasmático, o que limita de forma significativa a presença de sistemas antioxidantes endógenos, além de membranas plasmáticas e mitocondriais ricas em ácidos graxos poli-insaturados, como o ácido docosaheptaenoico (DHA), fundamentais para a fluidez e funcionalidade da membrana, porém extremamente vulneráveis à peroxidação lipídica. Nesse contexto, o equilíbrio redox definido pela relação dinâmica entre a produção de EROs e a capacidade antioxidante celular é determinante para a manutenção da viabilidade, motilidade e capacidade fecundante do sêmen bovino (Aitken; Drevet, 2020).

As EROs, incluindo o ânion superóxido (O_2^-), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH), são produzidas fisiologicamente pelos espermatozoides, principalmente como subprodutos do metabolismo mitocondrial durante a fosforilação oxidativa, bem como pela atividade de enzimas como as NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida) oxidases localizadas na membrana plasmática. Em concentrações controladas, essas espécies exercem papel essencial como moléculas sinalizadoras envolvidas em eventos-chave da fisiologia espermática, como a capacitação, a hiperativação e a reação acrossomal. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio redox com produção excessiva de EROs, instala-se o estresse oxidativo, culminando em alterações estruturais e funcionais que comprometem severamente a fertilidade do macho (Folchini et al., 2012).

A peroxidação lipídica constitui um dos principais mecanismos pelos quais o estresse oxidativo exerce seus efeitos deletérios sobre os espermatozoides bovinos. Esse processo é iniciado quando EROs altamente reativas, especialmente o radical hidroxila, atacam os ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares, promovendo a abstração de átomos de hidrogênio e a formação de radicais lipídicos. Esses radicais reagem rapidamente com o oxigênio molecular, originando radicais peroxila (ROO), que propagam reações em cadeia ao longo da bicamada lipídica. Como resultado, são gerados produtos secundários altamente citotóxicos, como o malondialdeído (MDA) e o 4-hidroxinonenal, os quais alteram a fluidez, a permeabilidade e a integridade das membranas, prejudicando o transporte iônico, a estabilidade mitocondrial e a capacidade de fusão espermatozoide–oócito (Walters et al., 2018).

A criopreservação do sêmen bovino, amplamente empregada em programas PIVE, intensifica de maneira expressiva a geração de EROs e os processos de peroxidação lipídica. Durante as etapas de refrigeração, congelamento e descongelamento, os espermatozoides são submetidos a estresse térmico, osmótico e mecânico, que promovem desorganização da barreira lipídica das membranas e disfunções mitocondriais. O momento mais crítico é a descongelamento, pois está associado a um aumento abrupto da produção de EROs, amplificando a peroxidação lipídica, a perda da integridade de membrana e a redução da viabilidade e motilidade espermática (Junior; Siqueira, 2025).

Diante desse cenário, a suplementação de diluentes seminais com antioxidantes tem sido amplamente investigada como estratégia para mitigar os efeitos deletérios do estresse oxidativo, como por exemplo a peroxidação lipídica. A eficácia desses compostos depende diretamente de sua capacidade de atuar em diferentes compartimentos celulares, neutralizando EROs antes que iniciem ou propaguem reações oxidativas nas membranas lipídicas. Entretanto, a literatura

ressalta que a concentração utilizada é fator crítico, uma vez que concentrações excessivas de antioxidantes podem exercer efeito pró-oxidante ou interferir negativamente nos processos fisiológicos dependentes de EROs, como a capacitação espermática (Pintus; Ros-Santaella, 2021).

Entre os antioxidantes sintéticos mais estudados em bovinos destacam-se a glutathiona reduzida (GSH), a vitamina C e o Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E. A GSH desempenha papel central na detoxificação de peróxidos e na manutenção do estado redox intracelular, além de proteger grupos sulfidríla (SH) de proteínas estruturais e funcionais do espermatozoide. A vitamina C atua predominantemente no meio aquoso, neutralizando EROs antes que atinjam as membranas, enquanto o Trolox interrompe diretamente as reações em cadeia da peroxidação lipídica na bicamada lipídica. Estudos demonstraram que a utilização adequada desses antioxidantes pode melhorar a integridade de membrana, o potencial mitocondrial e reduzir a fragmentação de DNA em sêmen bovino pós-descongelamento (Duarte Junior et al., 2016; De Oliveira et al., 2024).

Nos últimos anos, antioxidantes naturais têm ganhado destaque devido à sua ação multifuncional e menor risco de efeitos pró-oxidantes. Compostos como a melatonina, o resveratrol, a quercetina, a carnosina e o composto fenólico hidroxitirosol (HT), apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e estabilizadoras de membrana (Duarte Junior et al., 2016; Balbi et al., 2025). A melatonina, além de atuar como sequestradora direta de EROs, exerce efeito protetor sobre a mitocôndria, reduzindo a apoptose espermática e preservando a motilidade e a integridade do DNA (Duarte Junior et al., 2016; Gutiérrez-Añez et al., 2021; Assunção et al., 2021). O resveratrol e a quercetina estão associados à redução da peroxidação lipídica e à manutenção da funcionalidade mitocondrial, enquanto a carnosina se destaca por neutralizar aldeídos reativos derivados da peroxidação lipídica, prevenindo a carbonilação proteica. Além disso, o equilíbrio redox é determinante também na eficiência da PIVE, uma vez que ambientes *in vitro* apresentam maior tensão de oxigênio e menor proteção antioxidante, favorecendo o acúmulo de EROs e comprometendo a competência oocitária, a fecundação e o desenvolvimento embrionário inicial (Silva et al., 2020; Assunção et al., 2021; Deluao et al., 2022).

Outro extrato natural que vem sendo testado no sêmen é o extrato da casca de noz pecã, tendo potencial de melhora, na motilidade e vigor espermático em sêmen resfriado (Silva et al., 2023). O extrato natural de NP apresenta elevado potencial antioxidante devido à presença de compostos fenólicos, taninos condensados e ácido gálico, substâncias reconhecidas por sua

capacidade de neutralizar EROs e reduzir danos celulares provocados pelo estresse oxidativo (Amaral et al., 2019). Esse extrato é obtido a partir da casca de *Carya illinoensis* (noz-pecã), o qual possui alta concentração de compostos bioativos com propriedades antioxidantes. Entre seus constituintes, destaca-se o ácido gálico (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico), considerado um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante do extrato, atuando na redução de EROs e na proteção das estruturas celulares contra processos oxidativos (Benvegnú et al., 2013).

Além disso, estudos têm investigado o comportamento da célula espermática com diferentes concentrações do extrato no sêmen congelado e também aplicação desse extrato em biotecnologias reprodutivas, como na IATF, por meio da adição de concentrações baixas do composto ao sêmen bovino resfriado, obtendo resultados similares a sêmen provenientes de centrais de coletas. Nesse contexto, o sêmen diluído com extrato natural antioxidante foi utilizado para inseminar vacas submetidas a protocolo de IATF, demonstrando que a inclusão do composto pode ser empregada sem comprometer a viabilidade espermática e permitindo sua utilização em programas reprodutivos para avaliação de taxas de gestação em fêmeas bovinas (Silva et al., 2023; Trenkel, 2024)

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar os efeitos de um extrato natural da casca de noz pecã, com potencial antioxidante adicionado, no sêmen utilizado na PIVE a partir de ovários bovinos provenientes de frigorífico abatedouro.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar o efeito de dois meios de cultivo sobre a PIVE utilizando sêmen congelado com diferentes concentrações de NP adicionado ao diluidor seminal.

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de NP adicionadas ao diluidor do sêmen bovino congelado sobre a formação de pró-núcleos em zigotos 16 horas pós-fertilização.

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de NP adicionadas ao diluidor do sêmen bovino congelado sobre a taxa de clivagem embrionária.

Avaliar o efeito de diferentes concentrações de NP adicionadas ao diluidor do sêmen bovino congelado sobre a contagem total de células embrionárias em 168 horas pós-fertilização.

Avaliar a interação entre meio de cultivo e concentração de NP sobre os parâmetros analisados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal – LABRA, *Campus Realeza*, Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), Realeza, Paraná, em parceria com um Laboratório de PIVE privado (Sêminna[®]), localizado na cidade de Francisco Beltrão, Paraná.

O sêmen utilizado na FIV faz parte de uma linha de pesquisa já desenvolvida no LABRA (PES 2023-0295).

Por se tratar de um estudo *in vitro*, utilizando-se ovários de abatedouros comerciais, a realização dessa dissertação dispensou a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFFS).

Todos os processos da PIVE e armazenamento das estruturas para avaliação posterior dos zigotos e embriões foram realizados no laboratório parceiro, enquanto a avaliação dos zigotos e embriões, sob coloração, foi realizada no LABRA.

4.1 EXTRAÇÃO DO EXTRATO NATURAL (NP) E CONGELAÇÃO DO SÊMEN

O extrato da natural foi obtido a partir de cascas de um tipo de noqueira (noz pecã) fornecidas pela empresa Divinut, situada no município de Cachoeira do Sul, Rio Grande do Sul. Inicialmente, o material vegetal foi higienizado em água corrente, submetido à secagem em estufa a 36 °C por um período de 24 horas, e então maceradas com o auxílio de almofariz e pistilo de porcelana. Posteriormente, 50 g do material triturado foi pesado em balança analítica para obtenção do NP, que foi realizada no Laboratório de Química, do *Campus Realeza*, da UFFS, por meio do método de extração em Soxhlet (Amaral et al., 2019).

Utilizou-se sêmen congelado de um reprodutor, obtido em oito partidas diferentes. Em cada partida o sêmen foi dividido em quatro grupos, contendo meio diluidor e concentração de NP característico de cada grupo experimental, envasado manualmente em palhetas de 0,25 mL (10×10^6 espermatozoides viáveis), previamente identificadas de acordo com o grupo experimental e número da coleta, e certificado da viabilidade espermática (CASA - IVOS- IIR[®], Hamilton Thorne) (Trenkel, 2024), como se segue:

- . Grupo 1: Controle, sêmen diluído;
- . Grupo 2: Sêmen diluído, acrescido de 0,5% de NP;
- . Grupo 3: Sêmen diluído, acrescido de 0,75% de NP;
- . Grupo 4: Sêmen diluído, acrescido de 1% de NP.

As palhetas foram vedadas com álcool polivinílico e submetidas ao protocolo convencional de criopreservação (Salisbury et al., 1978). Após o envase, as palhetas foram submetidas ao processo de resfriamento por quatro horas em caixas isotérmicas (Botuflex®), visando atingir a temperatura de 4°C, com uma taxa de resfriamento aproximada de -0,14 °C por minuto. Em seguida, as caixas foram abertas e as palhetas expostas ao vapor de nitrogênio por 12 minutos, caracterizando a etapa de pré-congelação. Durante esse período, foram mantidas na posição horizontal, a uma distância quatro centímetros da lâmina de nitrogênio (Salisbury; Vandemark; Lodge, 1978; Trenkel, 2024).

Posteriormente, as palhetas foram imersas em nitrogênio líquido a -196 °C e armazenadas em botijões criogênicos até o momento de sua utilização.

4.2 COLETA, AVALIAÇÃO E SELEÇÃO DOS COCs

Coletou-se ovários de fêmeas bovinas durante oito vezes, com o objetivo de aspirar COCs presente nos folículos ovarianos, provenientes de abatedouro frigorífico comercial localizado do Município de Marmeleiro, Paraná.

Tão logo coletados no frigorífico, os ovários foram armazenados em solução fisiológica a 0,9%, com temperatura controlada (entre 36°C e 37°C) e transportados até o Laboratório de PIVE parceiro.

No Laboratório, os ovários foram lavados em NaCl estéril (0,9%) por três vezes, e folículos ovarianos de 2 a 8 mm puncionados com agulha (40x12 - 18G), acoplada a seringa descartável de 20mL. O fluido folicular aspirado foi direcionado lentamente para tubo plástico estéril de 50mL pré-aquecido (37-38°C) e submetido à repouso em banho-maria por cinco minutos para a sedimentação do material genético.

O sedimento foi despejado em placa de Petri de 90mm (Sarstedt®) para rasteio, identificação e seleção dos oócitos, com auxílio de estereomicroscópio (Olympus SZ51®). Para classificação dos oócitos considerou-se a qualidade das células dos COCs e do aspecto citoplasmático, em viáveis e desnudos, de acordo com Viana et al. (2004) e Mariano et al. (2015), como se segue:

- . Grau I: oócito com citoplasma homogêneo, COCs compactos, escuro, contendo diversas camadas de células do *cumulus*;
- . Grau II: oócito com citoplasma heterogêneo com regiões escuras na periferia, COCs compactos, de coloração clara, com três a cinco camadas de células do *cumulus*;

- . Grau III: oócito com citoplasma irregular, COCs escuros, com poucas células do *cumulus*,
- . Grau IV: oócito com citoplasma uniforme, sem presença de células do *cumulus*, completamente desnudos.

Os COCs inseridos nesse estudo foram classificados em Grau I, II e III, e então subdivididos em dois grupos de acordo com o meio utilizado para a maturação *in vitro* (MIV): Grupo M1 e Grupo M2. No Grupo M1 utilizou-se um meio de maturação base e no Grupo M2 utilizou-se um meio de maturação comercial (Bioklone[®]).

Realizou-se duas placas por grupo experimental, com quatro gotas por placa, contendo até 20 COCs por gota, totalizando até 160 COCs por grupo de maturação.

4.3 MATURAÇÃO *IN VITRO* (MIV)

Na MIV os oócitos foram submetidos a lavagem tripla em meio de lavagem de acordo com o grupo (M1-Base – Anexo I e M2-Comercial – Bioklone[®]) e submetidos ao cultivo para maturação, realizada em duas placas de Petri de 35 mm tratadas para esse fim (Sarstedt[®]).

Para cada grupo, foram feitas gotas de 100 uL de meio de maturação, considerando quatro gotas por placa, contendo no máximo 20 oócitos/gota, recobertas por 3,5 mL de óleo mineral (FUJIFILM Irvine Scientific[®]) para melhor circulação gasosa e evitar a evaporação do meio. Em cada grupo utilizou-se duas placas.

As placas foram acondicionadas em estufa (THERMO[®]) de maturação em atmosfera controlada com 5,5% de CO₂ e 20% de O₂, com umidade saturada e temperatura estável entre 38 °C e 39 °C, por 24 horas.

4.4 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

Para a FIV, as gotas do grupo de maturação foram sub-divididas em quatro subgrupos de acordo com o sêmen a ser utilizado.

Após 24 horas de maturação, os oócitos das gotas de cada placa/grupo de maturação foram submetidos à FIV em placas de cultivo celular de 35 mm, contendo microgotas de 40 µL de meio de FIV específico (FERT-TALP Base e BioKlone[®]), recobertas com 3,5 mL de óleo mineral (Irvine[®]). Foram utilizadas duas concentrações de sêmen congelado da mesma partida

por grupo experimental, acondicionadas em palhetas de 0,25 mL, totalizando oito palhetas por rotina de experimento.

As palhetas foram descongeladas em banho-maria a 36 °C, e o conteúdo transferido para microtubo tipo Eppendorf de 1,5 mL, contendo gradiente descontínuo de Percoll a 90% e 45%, composto por 200 µL de Percoll 90% e 200 µL de Percoll 45% (100 µL de Percoll 90% diluído em 100 µL de meio TL-Sêmen). A suspensão foi centrifugada por seis minutos a $4.427 \times g$, visando à separação dos espermatozoides do meio diluidor.

Após a passagem pelo gradiente de Percoll, o *pellet* espermático formado no fundo do tubo foi submetido a uma segunda centrifugação, realizada com 1mL de meio de FIV, por três minutos a $1.107 \times g$, com o objetivo de remover resíduos do gradiente e padronizar o meio de suspensão espermática. Ao final desse procedimento, 50 µL do sedimento espermático foram recuperados e transferidos para microtubo contendo 50 µL de meio FIV, totalizando 100 µL de suspensão espermática. A partir dessa suspensão, foram retiradas alíquotas de 5 µL, e transferidas para microtubos contendo 150 µL de meio FIV-gotas, destinada à avaliação da motilidade espermática, e outra transferida para microtubo contendo 250 µL de água, utilizada para a determinação da concentração espermática. Após a retirada dessas alíquotas, o microtubo contendo sêmen e meio FIV apresentava volume final de 90 µL, correspondente ao volume do sedimento espermático.

A concentração espermática foi determinada por meio da contagem dos espermatozoides em cinco retículos da câmara de Neubauer, sendo os valores obtidos utilizados para o ajuste da concentração espermática a ser empregada nas microgotas de fecundação. O volume de meio FIV a ser adicionado ao microtubo contendo a suspensão espermática foi calculado pela diferença entre o volume final desejado e o volume do sedimento (90 µL).

Após o ajuste da concentração, a suspensão espermática foi homogeneizada e 4µL da mistura foi adicionada a cada microgota da placa de FIV, considerando 25 mil espermatozóides por µL. Esse procedimento resultou em concentração final aproximada de 100 mil espermatozoides viáveis por microgota da FIV, considerando 20 oócitos por microgotas, o que corresponde à proporção de cinco mil espermatozoides por oócito.

A FIV foi realizada em estufa (THERMO®), com atmosfera controlada de 5% de CO₂, 20% de O₂, com umidade saturada e temperatura estável entre 38 °C e 39 °C.

4.4.1 Avaliação da formação de pro-núcleos com 16 horas após FIV

Após a MIV e a FIV, um número máximo de 40 estruturas por grupo experimental foi utilizado, e então subdivididas e cultivadas em dois sistemas distintos de cultivo embrionário, meio Base e meio comercial BioKlone[®]. Em cada sistema, os embriões foram distribuídos em dois momentos de avaliação: Momento 1 (M1) e Momento 2 (M2).

O M1 foi destinado à avaliação da taxa de fertilização, por meio da identificação da formação de pró-núcleos, realizada 16 horas pós-FIV (HPF). Já o M2 seguiu para os demais processos da PIVE.

Inicialmente, os oócitos/zigotos do M1 foram submetidos ao processo de desnudamento ainda na placa de FIV, com o objetivo de remover as células do *cumulus* remanescente, e então, transferidas sequencialmente em duas gotas de 100 µL de solução salina tamponada com fosfato suplementado com 0,2% de poli-vinil-álcool (PBS-PVA).

Na primeira gota, realizou-se pipetagem repetida com micropipeta de 200µL de diâmetro adequado para promover a remoção do excesso de células do *cumulus*. Na segunda gota de PBS, procedeu-se à retirada do material celular residual ainda presente na suspensão. Após o completo desnudamento, os oócitos/zigotos foram transferidos para gota de 100µL de PBS suplementada com 4,0% de paraformaldeído, permanecendo em contato inicial com o fixador, e então acondicionados em microtubos (tipo Eppendorf) contendo 200µL de paraformaldeído previamente preparado, de modo a completar um volume final de 300µL, onde permaneceram em fixação por 24 horas, armazenados em refrigeração (4 °C).

Decorrido o período de fixação, os zigotos foram transferidos para criotubos de 2mL, contendo 300µL de PBS-PVA. A transição do paraformaldeído para o PBS-PVA foi realizada por meio da passagem dos zigotos em duas gotas de PBS (100µL cada), garantindo a remoção adequada do excesso de fixador. Após o acondicionamento final em PBS-PVA, os criotubos foram armazenados sob refrigeração (4°C) até a coloração nuclear e avaliação da fecundação, por meio do corante Hoechst[®] para indicar ou não a formação de pró-núcleos.

4.5 CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

De 18 a 22 horas após a FIV, os oócitos da Gota 2 de cada subgrupo seguiram para o cultivo *in vitro*, no qual os zigotos foram realocados para placas de cultivo, contendo meio para CIV (meio base e comercial), por 168 horas até que alcancem o estágio de blastocisto. O cultivo dos zigotos foi realizado em estufa EVE (WTA Technologies[®]), com atmosfera

controlada em 5% de O₂, 5,5% de CO₂ e N₂ balanço, com umidade saturada, mantidos a uma temperatura de 38,5 °C.

4.5.1 Contagem de estruturas clivadas (48 HPF) e blastocistos (168 HPF)

A partir dos embriões destinados a avaliação do M2 foram avaliados a taxa de clivagem 48 HPF, considerando-se o número de estruturas clivadas por gota de cultivo.

Posteriormente mantidos em cultivo *in vitro* até 168 HPF, período correspondente ao estágio final de desenvolvimento embrionário, os embriões foram destinados para realização das análises adicionais do desenvolvimento embrionário (IETS, 1998) ao longo das oito repetições experimentais: produção de blastocistos por gota e número de células embrionárias nos embriões desenvolvidos.

4.5.2 Preparo e utilização do corante Hoechst 33342

Para avaliação nuclear, utilizou-se o fluorocromo Hoechst 33342/DAPI, corante fluorescente específico para DNA, com alta afinidade por regiões ricas em adenina-timina, permitindo a visualização dos núcleos celulares sob microscopia de fluorescência, segundo metodologia de Moreira et al. (2001) com modificações. Inicialmente, um frasco de 25mg do corante foi dissolvido em 2,5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se a solução estoque primária. Essa solução foi preparada diretamente no frasco âmbar original do corante, com o objetivo de reduzir a exposição à luz e preservar a estabilidade do corante. A partir da solução estoque primária, foi realizada uma primeira diluição, na qual 20µL da solução estoque foi transferida para um microtubo tipo Eppendorf contendo 200µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS), resultando em uma solução intermediária para trabalho.

No momento da utilização, essa solução intermediária foi submetida a uma segunda diluição, na qual 10µL da solução intermediária foi adicionada a 500µL de PBS, obtendo-se a solução final de Hoechst 33342 utilizada para a coloração nuclear. Essa solução final foi preparada em microtubos tipo Eppendorf de 1,5mL, protegidos da luz.

Quando a solução intermediária não foi utilizada imediatamente, foram preparadas alíquotas de 10µL, acondicionadas em microtubos de 1,5mL individuais e armazenadas em freezer a -20 °C, evitando ciclos repetidos de congelação e descongelação, a fim de preservar a eficiência do corante. Durante todo o procedimento de preparo, armazenamento e utilização

do Hoechst 33342, as soluções foram mantidas protegidas da luz, minimizando a fotodegradação do corante.

4.5.3 Coloração Nuclear para avaliação da formação dos pro-núcleos e contagem do número de células nos embriões 168 HPF

Após o período de armazenamento em PBS-PVA a 4°C, os oócitos e embriões foram submetidos à coloração nuclear para avaliação da fecundação e do estágio de desenvolvimento embrionário. Para essa finalidade, utilizou-se o corante fluorescente Hoechst 33342, específico para ligação ao DNA.

Inicialmente, os oócitos/zigotos previamente fixados em paraformaldeído foram transferidos para duas gotas sucessivas de PBS (100 µL cada), com o objetivo de remover completamente os resíduos do fixador. Em seguida, as estruturas foram incubadas em uma gota de 100µL de solução de Hoechst 33342, preparada em PBS, na concentração final de 10 µg/mL, conforme protocolo com modificações para embriões bovinos (Moreira et al., 2001).

A incubação foi realizada à temperatura ambiente, em ambiente protegido da luz, por um período de 10 a 15 minutos, permitindo adequada penetração do corante e ligação ao DNA nuclear. Após a coloração, os zigotos e embriões foram novamente lavados em duas gotas de PBS (100 µL cada), a fim de remover o excesso de corante não ligado.

A avaliação foi realizada por microscopia de epifluorescência com microscópio invertido (Nikon® - Eclipse Ts2), utilizando filtro específico para excitação na faixa do comprimento de onda ultravioleta (aproximadamente 350nm). As estruturas foram montadas em lâminas de microscopia contendo uma pequena gota de glicerina, recobertas com lamínula e mantidas protegidas da luz até o momento da análise.

A avaliação da formação dos pró-núcleos foi confirmada pela presença de dois ou um pró-núcleo, enquanto oócitos não fecundados foram identificados pela ausência de pró-núcleos. Já nos embriões com 168 HPF, o número de núcleos corados foi utilizado para avaliação do estágio de desenvolvimento por contagem celular.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O estudo seguiu um delineamento inteiramente casualizado, adotando-se um arranjo fatorial 2×4, composto por dois meios de cultivo e quatro níveis de extrato natural. Inicialmente,

avaliou-se a interação entre os níveis de inclusão do extrato natural e os meios de cultivo para todas as variáveis analisadas.

Entretanto, como essa interação não apresentou efeito significativo ($p > 0,05$) para nenhuma das variáveis dependentes, ela foi retirada do modelo estatístico, procedendo-se à análise considerando apenas os efeitos principais.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância por meio do procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS. O modelo matemático utilizado foi expresso por:

$$Y_{ij} = \mu + K_i + T_j + \varepsilon_{ij}$$

em que Y_{ij} corresponde às variáveis dependentes avaliadas; μ representa a média geral das observações; K_i refere-se ao efeito do i -ésimo nível de inclusão do extrato natural; T_j corresponde ao efeito do j -ésimo meio de cultivo; e ε_{ij} representa o erro residual aleatório, assumido como normalmente distribuído.

As médias dos tratamentos foram inicialmente avaliadas pelo Teste F, considerando efeito significativo ($p < 0,05$). Para os níveis de inclusão do extrato natural, as médias correspondentes foram comparadas entre si por meio do Teste de Tukey, adotando-se nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$). Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SAS (Statistical Analysis System), versão 9.2.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Durante as oito repetições do experimento foram aspirados, 2.191 COCs dos ovários de fêmeas bovinas obtidos em abatedouro (Tabela 1), sendo 17,7% classificados em Grau I (GI), 27,0% em Grau II (GII) e 55,3% Grau III (GIII), como ilustrado na Figura 1.

Tabela 1: Quantidade de COCs de ovários de fêmeas bovinas de abatedouros, selecionados e classificados como Grau I, II e III.

Repetição	Número COCS			
	Aspirados	Classificação		
		GI (n)	GII (n)	GIII (n)
1	310	52	94	164
2	223	40	73	110
3	270	45	79	146
4	282	67	87	128
5	289	41	90	158
6	256	35	51	170
7	305	65	62	178
8	256	43	56	157

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Figura 1: COCs aspirados de ovários de fêmeas bovinas de abatedouros, selecionados e classificados como Grau I, II e III.



Legenda: A - Circulo delimitando um oócito GI, B – Circulo delimitando um oócito GII, C – Circulo delimitando um oócito GIII. Fonte: Arquivo pessoal 2025.

De forma semelhante, Batista et al. (2016) observaram maior frequência de COC grau III, em estudo sobre a qualidade morfológica de oócitos aspirados de ovários de abatedouro com e sem a presença de corpo lúteo (CL), onde observaram 15% de COCs classificados como GI, 27% como GII e 43% como GIII, sendo os outros 10% GIV e 6% atresícos, indicando

predominância de estruturas de qualidade intermediária ou inferior. Esses achados corroboram com o padrão de distribuição da qualidade de COCs aspirados observado no presente estudo (Tabela 1).

Já no estudo de Barboza & Da Costa (2024), ao realizaram uma análise quantitativa de oócitos de cinco diferentes graus provenientes de ovários de abatedouro após três coletas, observaram proporções distintas entre os COCs GIV (16,9%) e GV (31,6%), e proporções parecidas nos classificados como GII (20,1%) e GIII (20,8%), enquanto o COCs de melhor qualidade (GI) apresentaram menor frequência (10,4%). Esse padrão reforça que, em sistemas de recuperação oocitária a partir de ovários de abatedouro, uma fração menor das estruturas recuperadas apresenta características morfológicas consideradas ideais, como também foi observado no presente estudo.

A predominância de COCs classificados como GII e GIII é frequentemente relatada na literatura, uma vez que a população folicular presente nos ovários de abatedouro apresenta diversos estádios de desenvolvimento folicular. Nesse contexto, a morfologia dos COCs constitui um dos principais indicadores de competência embrionária, sendo os oócitos com *cumulus* compacto e múltiplas camadas celulares geralmente são associados a maior taxa de maturação, clivagem e desenvolvimento até o estágio de blastocisto (Gottardi; Mingoti, 2009).

Na Tabela 2 observou-se diferença nas taxas de clivagem e produção embrionária entre os meios de cultivo avaliados. O meio comercial BioKlone® apresentou desempenho superior ao meio Base, com maiores índices médios de clivagem e desenvolvimento embrionário.

Tabela 2: Quantidade de oócitos, taxas de clivagem e produção embrionária obtidas nos meios de cultivo Base e BioKlone® durante a PIVE.

Meio	Amostra	Oócitos	Cliv	Cliv%	Emb	Emb%
Base	1	83	66	80%	25	30%
	2	54	34	63%	17	31%
	3	75	47	63%	22	29%
	4	71	52	73%	16	23%
	5	72	49	68%	22	31%
	6	68	37	54%	9	13%
	7	77	53	69%	22	29%
	8	69	55	80%	20	29%
Total		569	393	69%	153	27%
Bioklone®	1	84	73	87%	37	44%
	2	51	41	80%	13	25%
	3	62	48	77%	22	35%
	4	70	52	74%	15	21%
	5	73	56	77%	23	32%
	6	66	61	92%	24	36%
	7	79	56	71%	27	34%
	8	69	37	54%	22	32%
Total		554	424	77%	183	33%

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

No M1, foram avaliados 569 oócitos, dos quais 393 apresentaram clivagem, correspondendo a uma taxa média de clivagem de 69%. A produção embrionária total foi de 153 embriões, resultando em taxa média de produção embrionária de 27%. Entre as oito repetições do experimento, observou-se variação nas taxas de clivagem, com valores entre 54% e 80%, enquanto a produção embrionária variou entre 13% e 31%. A menor taxa de desenvolvimento embrionário foi observada na amostra 6, com apenas 13% de embriões produzidos.

No M2 foram avaliados 554 oócitos, dos quais 424 apresentaram clivagem, resultando em taxa média de clivagem de 77%. A produção embrionária total foi de 183 embriões, correspondendo a taxa média de produção embrionária de 33%. As taxas de clivagem variaram entre 54% e 92%, enquanto a produção embrionária oscilou entre 21% e 44%. A maior taxa de produção embrionária foi observada na amostra 1, com 44% de embriões produzidos.

Nesse comparativo, observou-se melhora numérica na taxa de clivagem e produção embrionária do M2 em relação ao M1. Esses resultados podem sugerir melhor desempenho do meio comercial sobre o desenvolvimento embrionário inicial e a competência de cultivo *in vitro*, possivelmente relacionado à composição do meio e à maior capacidade de manutenção

do estresse oxidativo e das condições metabólicas e adequadas ao desenvolvimento embrionário.

A Tabela 3 mostra a porcentagem de zigotos por meio da formação de pró-núcleos, considerando o meio de cultivo (base e comercial) e a concentração de NP no sêmen utilizado para a FIV.

Tabela 3: Porcentagem de zigotos formados 16 HPF (horas após FIV) considerando dois meios de cultivo e diferentes concentrações de extrato natural (NP) utilizado no sêmen.

Variável (%)	Meio de cultivo		Concentração NP sêmen (%)				Valor de P	
	Base	Comercial	Controle	0,50	0,75	1,00	NP	Meio
Zigotos	85,5±1,2	86,5±1,2	85,1±2,1	85,8±2,1	85,3±2,1	87,7±2,1	0,819	0,641
Sem pró-núcleo	14,4±1,4	12,8±1,4	13,8±2,0	13,4±2,0	13,4±2,0	12,3±2,0	0,825	0,426

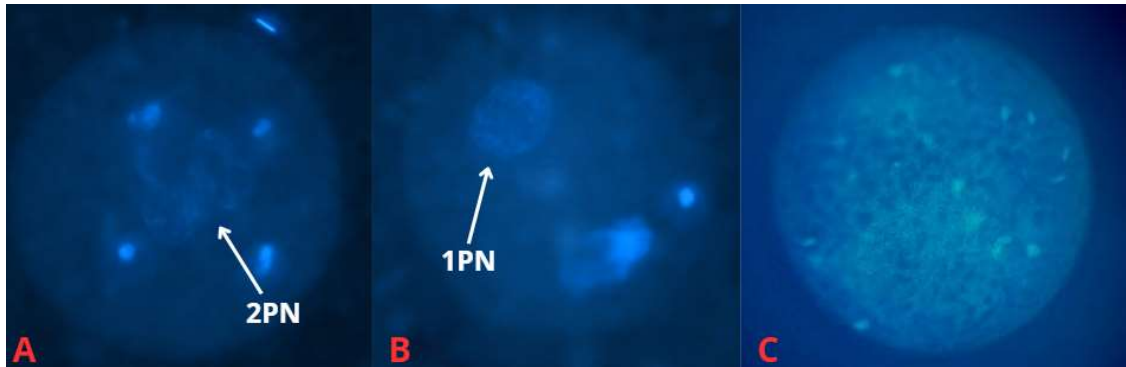
Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

A taxa média de zigotos formados foi semelhante nos meios utilizados, sendo de 85,5% e 86,5%, para os meios base e comercial ($p < 0,05$). Também não se observou efeito da concentração do NP no sêmen utilizado na FIV sobre a formação de zigotos ($p > 0,05$ - Tabela 3). De maneira semelhante, a proporção de zigotos sem pro-núcleo (OPN) teve uma constância entre os tratamentos, variando de 12,3% a 14,4%, indicando que a adição de NP não interferiu no processo inicial de ativação oocitária ($p < 0,05$). Esses achados sugerem que a penetração espermática e o desencadeamento das oscilações de Ca^{2+} responsáveis pela ativação do oócito ocorreram de maneira adequada independentemente do tratamento aplicado.

A avaliação do número de pró-núcleos constitui um dos principais indicadores da fecundação normal na FIV. Em condições fisiológicas, a presença de dois pro-núcleos (2PN) aproximadamente 16–18 horas após a FIV, indica sucesso da técnica, resultante da formação do pró-núcleo masculino e feminino após a descondensação da cromatina espermática e reorganização do genoma materno. Entretanto, estruturas com um pro-núcleo (1PN) ou ausência de pro-núcleo (OPN) também são frequentemente observadas em sistemas de FIV (Georgadaki et al., 2016; Uzun et al., 2021), como também foi observado nesse estudo.

A Figura 2 apresenta estruturas avaliadas 16 horas após a FIV, sem ativação do zigoto (zero pró-núcleo) e com um ou dois pró-núcleos.

Figura 2: Estruturas avaliadas 16 HPF (horas após FIV) contendo dois, um e nenhum pronúcleo respectivamente, coradas com Hoechst 33342/DAPI.



Legenda: **A**– Observação de dois pronúcleos; **B** – Observação de um pronúcleo; **C** – Estrutura sem a presença de pronúcleo. Fonte: arquivo pessoal, 2026

Além disso, falhas em diferentes etapas moleculares da fertilização também podem comprometer a formação adequada dos pro-núcleos. Alterações na expressão de receptores da membrana do oócito, como CD9, defeitos na fusão dos gametas, oscilações anormais de Ca^{2+} ou falhas na exocitose dos grânulos corticais podem levar à descondensação defeituosa da cromatina espermática e à formação anormal de pronúcleos (Georgadaki et al., 2016).

A ativação oocitária em mamíferos constitui o evento central que desencadeia a transição do oócito bloqueado em MII para o estágio de zigoto. Em condições fisiológicas, esse processo é iniciado pela entrada do espermatozoide e pela liberação da fosfolipase C zeta ($\text{PLC}\zeta$), a qual desencadeia oscilações repetidas de Ca^{2+} intracelular a partir dos estoques do retículo endoplasmático, caracterizando o principal sinal da ativação (Saunders et al., 2002; Swann et al., 2006). Com isso essas oscilações promovem a ativação do complexo promotor da anáfase, levando à degradação da ciclina B, inativação do fator promotor de maturação (MPF; CDK1–ciclina B). Como consequência, ocorre a conclusão da meiose II, extrusão do segundo corpúsculo polar e reorganização da cromatina materna para formação do pró-núcleo feminino (Swann et al., 2006).

Suzuki et al. (2021) observaram em embriões bovinos produzidos *in vitro* proporções aproximadas de 72,7% de zigotos 2PN, 6,5% de zigotos 1PN e 10,1% de estruturas 0PN, evidenciando que a presença de fertilizações anormais representa uma parcela relativamente comum dos embriões produzidos *in vitro*. De forma semelhante, Walters et al. (2006) demonstraram que alterações na qualidade espermática podem comprometer a formação adequada do pró-núcleo masculino, resultando em maior ocorrência de zigotos com cromatina espermática condensada ou falha na formação do pró-núcleo masculino.

Oócitos maturados *in vitro* podem apresentar maior suscetibilidade à ativação espontânea devido a alterações na dinâmica de MPF e no equilíbrio redox intracelular (Marques et al., 2011). Além disso, a ativação partenogenética espontânea também pode resultar em estruturas sem pró-núcleo visível no momento da avaliação.

Quando se trata de desenvolvimento embrionário, embriões derivados de fertilizações anormais apresentam menor competência de desenvolvimento. Estudos mostraram que zigotos com 1PN apresentam taxas de blastocisto significativamente menores quando comparados a zigotos com 2PN, refletindo comprometimento no desenvolvimento embrionário inicial (Walters et al., 2006). Esses achados corroboram com a interpretação de que alterações na dinâmica de formação dos pró-núcleos podem impactar negativamente etapas posteriores do desenvolvimento embrionário, o que poderia explicar os achados desse estudo.

Ao avaliar o desenvolvimento posterior, verificou-se redução significativa na taxa de clivagem e na produção de blastocistos com o aumento da concentração do NP no sêmen utilizado na FIV (Tabela 4). Esse resultado sugere que o extrato pode não interferir diretamente nos eventos iniciais de ativação oocitária, mas poderia ter afetado as etapas posteriores da fertilização, como a remodelação da cromatina espermática, a formação adequada dos pró-núcleos e/ou a estabilidade molecular necessária para a progressão do desenvolvimento embrionário.

Tabela 4: Porcentagem de embriões clivados e de embriões formados considerando a porcentagem de extrato natural com potencial antioxidante adicionado no meio diluidor do sêmen utilizado na FIV.

Variável avaliada (%)	Grupo experimental				Valor de p
	Controle	0,5%	0,75%	1%	
Embriões Clivados	80,6±3,0 ^A	76,6±3,0 ^A	70,0±3,0 ^A	56,9±3,0 ^B	<0,0001
Embriões formados	44,8±2,8 ^A	30,7±2,8 ^B	25,6±2,8 ^B	14,5±2,8 ^C	<0,0001

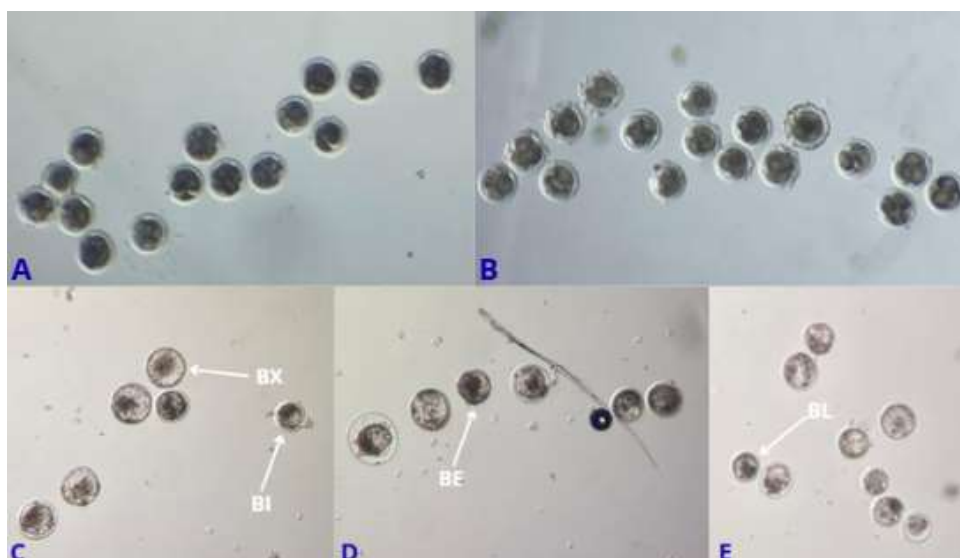
^{ABC}Valores seguidos por letras diferentes, na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey (p<0,05)

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Embora os resultados apresentados na Tabela 3 indicaram que a ativação oocitária e a formação inicial de zigotos tenham ocorrido de forma semelhante entre os tratamentos, na Tabela 4 observou-se que concentrações elevadas do NP podem ter comprometido os processos celulares subsequentes, refletindo na redução de embriões clivados e de embriões formados, à medida que se aumentava a concentração do extrato natural (Tabela 4).

A taxa de clivagem avaliada 48 HPF e os embriões avaliados 168 HPF, ilustrados na Figura 3, apresentaram redução nas taxas de clivagem e produção de blastocistos nos grupos com 1% de NP ($p<0,05$). Essa redução poderia sugerir que o extrato, na concentração de 1%, poderia ter afetado a integridade de membrana espermática, a interação com a zona pelúcida ou os eventos iniciais de ativação oocitária. Resultados semelhantes foram descritos por Silva et al. (2021), ao utilizarem dois meios diferentes de diluição de sêmen, sendo um a base de proteína vegetal e outro proteína animal, com concentrações de GSH de 1,5mM e 2,5mM respectivamente, e observarem 35 à 53% na taxa de clivagem e média de 35% na taxa de produção de blastocistos sem diferença significativa entre os grupos. Já Prado et al. (2012), ao avaliarem a clivagem e a produção de embriões *in vitro* utilizando sêmen diluído a base de lectina de soja e gema de ovo, observaram que o diluidor a base de gema de ovo apresentou desempenho superior na taxa de clivagem (62%) e formação de blastocistos (14%) em relação ao diluidor a base de lecitina, sendo de 60% e 12%, respectivamente. Ao se comparar os resultados do diluidor a base de lecitina descrito por Prado et al. (2012), observou-se semelhança aqueles encontrados nesse estudo, relativos a adição de 1% de NP.

Figura 3: Estruturas embrionárias observadas após início da divisão celular (2, 4 e 8 células), clivadas 48 HPF e embriões avaliados 168 HPV, fixados em paraformaldeído.



Legenda: A e B – Estruturas embrionárias após início de divisão celular (2, 4 e 8 células) 48 horas após FIV; C – Embriões em estágio de blastocisto expandido (BX) e blastocisto inicial (BI); D – Embrião em estágio de Blastocisto eclodido (BE); E – Embrião em estágio de blastocisto (BL). Fonte: Arquivo pessoal 2026.

Assunção et al. (2021) ao avaliarem a suplementação de resveratrol no diluente de sêmen bovino, com o intuito de a melhora na viabilidade do espermatozoide pós-descongelação nos índices de clivagem e formação de embriões na PIVE bovina, observaram melhora em

parâmetros espermáticos pós-descongelamento, não relatando alteração significativa nas taxas de clivagem e blastocisto, as quais permaneceram próximas entre os tratamentos sendo a clivagem de aproximadamente 74,6% no controle e 75,8% no grupo com resveratrol, e produção de blastocistos de 28,4% e 29,1%, respectivamente. Resultados semelhantes foram observados nesse estudo, como nos grupos controle e suplementados com a NP.

Não foram observadas diferenças entre o meio base e o meio comercial para clivagem e produção de blastocistos (Tabela 5), indicando então, que a principal fonte de variação nos resultados foi a concentração de NP no sêmen, e não o sistema de cultivo utilizado.

Tabela 5: Porcentagem de embriões clivados e de embriões formados considerando o meio utilizado na FIV, sem diferença significativa entre os meios.

Meio de cultivo	Porcentagem	
	Clivados	Embriões
Base	69,0 ± 2,1	27,3 ± 2,0
Comercial	73,0 ± 2,1	30,5 ± 2,0
Valor de p	0,1907	0,2478

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

Os resultados na porcentagem de embriões clivados e de embriões formados nos meios base e comercial reforça a importância do equilíbrio redox na FIV. Com isso o NP avaliado neste estudo poderia ter alterado a funcionalidade espermática quando utilizado em concentrações elevadas, especialmente em células previamente submetidas à criopreservação. Diferentemente de moléculas purificadas, o extrato obtido por processos de extração contém uma mistura de compostos fenólicos, taninos, peptídeos e outras substâncias potencialmente voláteis, cuja composição depende diretamente das condições de extração, como pH e uso de enzimas (Vieira et al., 2020), o que poderia subsidiar a funcionalidade espermática.

Isso implica que o espermatozoide não está exposto a um único composto com ação definida, mas sim a um conjunto de moléculas com diferentes propriedades biológicas. Nesse caso, é possível que parte desses compostos não interfira diretamente na capacidade fecundante, não impactando a penetração espermática, mas com ação negativa em processos posteriores, como a descondensação da cromatina e a formação adequada do pró-núcleo masculino (Simões et al., 2014).

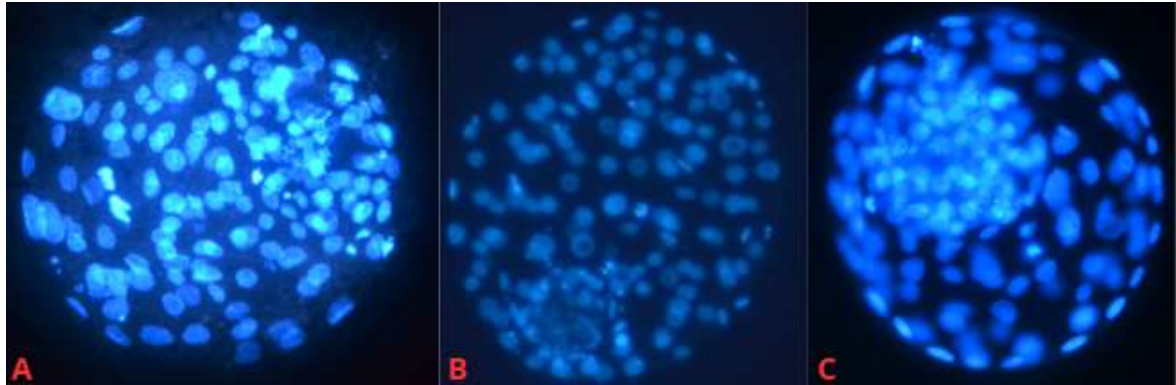
A redução da viabilidade embrionária observada com o aumento da concentração

do NP no sêmen utilizado para a FIV poderia estar associada à presença de compostos potencialmente tóxicos para o embrião. Esses compostos, mesmo que não impeçam a fecundação, poderiam desencadear morte embrionária precoce, possivelmente por indução de estresse oxidativo excessivo, interferência metabólica ou alterações epigenéticas. Assim, os resultados poderiam sugerir que o insucesso na produção de blastocistos não está necessariamente relacionado à falha na fecundação, mas sim a efeitos deletérios posteriores, decorrentes da exposição do espermatozoide a um extrato complexo.

Adicionalmente, o achado de alteração na funcionalidade espermática poderi ser explicado pelo papel central das EROs na função espermática. Os espermatozoides produzem EROs fisiologicamente, pois essas moléculas participam da capacitação espermática, regulando processos como fosforilação de proteínas em resíduos de tirosina, aumento de AMPc e remoção de colesterol da membrana plasmática, eventos essenciais para hiperativação e competência de fecundação (Sengupta et al., 2024; Junior; Siqueira, 2025). Assim, a utilização de antioxidantes em concentrações elevadas poderia reduzir excessivamente essas EROs e comprometer mecanismos dependentes de sinalização redox, resultando em menor capacidade fecundante.

O número total de células em blastocistos, sua visualização (Figura 6) e contagem (Tabela 6) é amplamente reconhecido como um dos principais indicadores de qualidade embrionária e competência de desenvolvimento, refletindo a capacidade proliferativa, a integridade metabólica e a adequada reprogramação pós-fecundação. No presente estudo, observou-se efeito significativo da porcentagem de adição do NP quando adicionada ao sêmen utilizado na FIV sobre a contagem celular dos blastocistos ($p < 0,05$), sem efeito o meio de cultivo (Tabela 6).

Figura 4: Blastocistos formados após 168 HPF, submetidos a técnica de coloração Hoechst 33342/DAPI.



Legenda: **A, B e C** – Blastocistos com coloração Hoechst 33342/DAPI identificando células totais. Fonte: Arquivo pessoal, 2026.

Tabela 6: Número de células de blastocisto 168 HPF de acordo com o meio de cultivo utilizado na PIVE.

Variável avaliada	Meio de cultivo		Valor de p
	Base	Bioklone	
Número de células	120,3 ± 2,7	122,9 ± 2,5	0,3993

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

O número médio de células dos blastocistos representados na Tabela 7 do grupo controle ($124,9 \pm 2,7$) e com adição de 0,75% NP ao sêmen ($126,1 \pm 3,5$) foi maior que o observado no grupo com adição de 1% de NP ($109,4 \pm 4,8$), que demonstrou redução significativa na proliferação embrionária ($p = 0,0178$), sugerindo efeito dependente da concentração de extrato, onde concentrações mais elevadas do NP poderim exercer impacto negativo sobre o desenvolvimento embrionário inicial.

Tabela 7: Número de células de blastocisto de acordo com a concentração de NP no sêmen utilizado na PIVE.

Variável avaliada	Concentração NP (%)				Valor de p
	Controle	0,5	0,75	1	
Número de células	$124,9 \pm 2,7^A$	$118,1 \pm 3,3^{AB}$	$126,1 \pm 3,5^A$	$109,4 \pm 4,8^B$	0,0178

Fonte: Elaborado pelo autor (2026).

*^{AB} Valores seguidos por letras diferentes, na mesma linha, diferem pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Balbi et al. (2025) ao avaliarem a suplementação de hidroxitirosol (HT) em diluente seminal bovino em sêmen resfriado e criopreservado, a fim de avaliar a capacidade antioxidante, parâmetros espermáticos, ligação a zona pelúcida e viabilidade na PIVE, observaram convergência parcial entre os resultados, onde a adição de 25 μ M de HT no sêmen criopreservado promoveu aumento significativo no número total de células dos blastocistos ($134,99 \pm 18,62$), e melhora nas taxas de desenvolvimento embrionário. Os autores atribuíram esse efeito à redução do estresse oxidativo espermático, preservação da integridade de membranas plasmáticas e manutenção da função mitocondrial, culminando em maior competência embrionária.

Enquanto o antioxidante avaliado por Balbi et al. (2025), apresentou efeito protetor consistente na concentração testada de 25 μ M no sêmen criopreservado, melhorando a capacidade de ligação a ZP (58%), taxas de blastocistos (27%) e número de células do blastocisto (135%), o uso de NP nesse trabalho não indicou efeito crescente positivo. A manutenção da contagem celular nas concentrações intermediárias de NP com o grupo 0,75%, sugere possível benefício fisiológico, porém quando aumentada, como observado na concentração 1% de NP, poderia comprometer mecanismos essenciais à progressão mitótica embrionária. Esse resultado poderia se associar a um possível desequilíbrio redox, visto que níveis excessivos de compostos antioxidantes poderiam interferir em vias de sinalização dependentes de EROs, que desempenham papel fisiológico na capacitação espermática e na ativação embrionária (Aitken; Drevet, 2020; Ferreira et al., 2023).

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, verificou-se que a adição de NP ao sêmen bovino utilizado na fertilização *in vitro*, exerceu efeito dependente da concentração sobre o desenvolvimento embrionário.

Embora o extrato não tenha alterado a ativação oocitária, nem a formação inicial de pronúcleos, sugere-se que os eventos iniciais da fertilização ocorreram de forma semelhante entre os tratamentos, concentrações mais elevadas reduziram as taxas de clivagem, a produção de blastocistos e a contagem celular dos blastocistos, e possível interferência do extrato em processos celulares posteriores à fecundação.

Assim, a utilização de antioxidantes naturais na PIVE requer atenção quanto à concentração e ao grau de purificação empregados, sendo necessários estudos adicionais, para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos e os efeitos do extrato sobre parâmetros espermáticos e embrionários.

7 REFERÊNCIAS

- AITKEN, R. J.; DREVET, J. R. The Importance of Oxidative Stress in Determining the Functionality of Mammalian Spermatozoa: A Two-Edged Sword. **Antioxidants**, v. 9, n. 2, p. 111, 27 jan. 2020.
- AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145-173, 1 jan. 1987.
- AMANN, R. P.; WABERSKI, D. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 5-17.e3, jan. 2014.
- AMARAL, A. A. et al. Antioxidant evaluation of extracts of pecan NutShell (*Carya illinoensis*) in soybean biodiesel B100. **Global Challenges**, v. 3, n. 11, p. 1900001, 2019.
- AMARAL, T. F. et al. Actions of CSF2 and DKK1 on bovine embryo development and pregnancy outcomes are affected by composition of embryo culture medium. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 7 maio 2022.
- ASSUNÇÃO, C. M. et al. Effects of resveratrol in bull semen extender on post- thaw sperm quality and capacity for fertilization and embryo development. **Animal Reproduction Science**, v. 226, p. 106697, 2021.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540-27557, 2015.
- BALBI, M. et al. Influence of hydroxytyrosol in semen extenders on fertilizing capacity and embryo development using cooled and cryopreserved bull sperm. **Theriogenology**, v. 250, p. 117702, 10 out. 2025.
- BARBOZA, K. J. W.; DA COSTA, C. P. Seleção e classificação de oócitos bovinos post mortem. **Revista JRG de Estudos Acadêmicos**, v. 7, n. 14, p. e141219-e141219, 2024.
- BATISTA, J. F. et al. Avaliação morfológica e nuclear de oócitos bovinos imaturos, obtidos de ovários com e sem a presença de corpo lúteo. **Colloquium Agrariae**, v. 12, n. 2, p. 01-10, 2016.
- BENVEGNÚ, D. M. et al. Protective effects of a by-product of the pecan nut industry (*Carya illinoensis*) on the toxicity induced by cyclophosphamide in rats. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 29, n. 3, 2010.
- BENVEGNÚ, D. M. et al. Aqueous extract of pecan nut shell (*Carya illinoensis* [Wangenh.] K. Koch) exerts protection against oxidative damage induced by cyclophosphamide in rat testis. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 32, n. 4, 2013.

- BERNHARDT, M. L. et al. TRPM7 and Ca V 3.2 channels mediate Ca²⁺ influx required for egg activation at fertilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 44, 15 out. 2018.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BURLA, A. A regulação da proteína quinase B (AKT) influencia na maturação citoplasmática *in vitro* de oócitos bovinos. **Confict**, 2017.
- CASON, C. et al. Antioxidant Properties of Pecan Shell Bioactive Components of Different Cultivars and Extraction Methods. **Foods**, v. 10, n. 4, p. 713, 27 mar. 2021.
- CASTIGLIONI, V. C. et al. Lipid peroxidation in bull semen influences sperm traits and oxidative potential of Percoll®-selected sperm. **Zygote**, v. 29, n. 6, p. 476-483, dez. 2021.
- CELEGHINI, E. C. C. et al. Relação entre a capacitação espermática e a fertilidade de sêmen criopreservado de bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 47, n. 2, p. 182-190, 2023.
- CRUZ, D. F. et al. Vias de sinalização reguladoras das funções do espermatozoide. **Revista Internacional de Andrología**, v. 12, n. 3, p. 104-111, 1 jul. 2014.
- CUNHA, A T. M. et al. Tratamento com espermatozoides epidírmicos bovinos para fertilização *in vitro*: A heparina acelera a fertilização e permite a redução do tempo de incubação. **PLoS One**, v. 14, n. 1, p. e0209692, 2019.
- DE LA ROSA, L. A. et al. Content of major classes of polyphenolic compounds, antioxidant, antiproliferative, and cell protective activity of pecan crude extracts and their fractions. **Journal of Functional Foods**, v. 7, p. 219-228, mar. 2014.
- DELUAO, J C. et al. OXIDATIVE STRESS AND REPRODUCTIVE FUNCTION: Reactive oxygen species in the mammalian pre-implantation embryo. **Reproduction**, v. 164, n. 6, p. F95-F108, 2022.
- DE OLIVEIRA, F. A. M. et al. Oocyte competence: A systematic review of omics studies and the state of art. **Theriogenology**, p. 117670, 2025.
- DE OLIVEIRA, L. et al. Efeitos da suplementação do meio com diferentes antioxidantes durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre o status oxidativo. **Ciência Animal**, v. 30, n. 4, p. 209-213, 2023.
- DE OLIVEIRA, W. et al. Viabilidade *in vitro* de sêmen bovino criopreservado com adição de vitamina C e trolox ao meio extensor. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 45, n. 5, p. 1349-1366, 2024.

DÍAZ-MIRANDA, E. A. et al. Peça intermediária de espermatozoides bovinos: Funções e anormalidades. **Rev. bras. reprod. anim.**, p. 30-35, 2018.

DO PRADO, A. C. P. et al. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 552-561, jan. 2014.

DOS SANTOS, M. M.; BIONDI, F. C.; OHASHI, O. M. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 5, p. 266-270, 2002.

DUARTE JUNIOR, M. F. et al. Utilização de pentoxifilina e antioxidantes na criopreservação do sêmen bovino: qualidade seminal e estresse oxidativo. **Ars Veterinaria**, p. 110-116, 2016.

EMERICK, L. L. et al. Avaliação da integridade de membrana em espermatozóide bovino criopreservado para prever o índice de prenhez. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, n. 3, p. 536-546, 2011.

ESPOSITO, G. et al. Mice deficient for soluble adenylyl cyclase are infertile because of a severe sperm-motility defect. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 9, p. 2993-2998, 2 mar. 2004.

FAN, H.Y. et al. MAPK3/1 (ERK1/2) in Ovarian Granulosa Cells Are Essential for Female Fertility. **Science**, v. 324, n. 5929, p. 938-941, 15 maio 2009.

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

FERREIRA, W. et al. Avaliação da capacitação espermática *in vitro* pela viabilidade e reação acrossômica. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 68-71, 1 jan. 2001.

FLESCHE, F. M.; GADELLA, B. M. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes**, v. 1469, n. 3, p. 197-235, nov. 2000.

FOLCHINI, N. P. et al. Uso de mini-Percoll modificado para seleção e redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em espermatozoides bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36, n. 4, p. 239-244, 2012.

GEORGADAKI, K. et al. The molecular basis of fertilization (Review). **International Journal of Molecular Medicine**, v. 38, n. 4, p. 979-986, 31 ago. 2016.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

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

GUEMRA, S. et al. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, p. 1616-1624, 2013.

GUTIÉRREZ-AÑEZ, J. C. et al. Melatonin improves rate of monospermic fertilization and early embryo development in a bovine IVF system. **PLoS ONE**, v. 16, n. 9, p. e0256701-e0256701, 2 set. 2021.

HE, M. et al. Mechanisms of Oocyte Maturation and Related Epigenetic Regulation. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, 19 mar. 2021.

HILBIG, J. et al. Aqueous extract from pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell show activity against breast cancer cell line MCF-7 and Ehrlich ascites tumor in Balb-C mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, p. 256-266, 30 jan. 2018.

ICKOWICZ, D.; FINKELSTEIN, M.; BREITBART, H. Mechanism of sperm capacitation and the acrosome reaction: role of protein kinases. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, n. 6, p. 816–821, 24 set. 2012.

JOHN, J. C. St; BOWLES, E. J.; AMARAL, A. Sperm mitochondria and fertilisation. **Soc. Reprod. Fertil. Suppl**, v. 65, p. 18, 2007.

JUNIOR, M. G. DE P.; SIQUEIRA, A. F. P. Estresse Oxidativo Do Sêmen Bovino Na Produção *In Vitro* De Embriões. **Revista Acadêmica Online**, v. 11, n. 55, p. e975, 30 jan. 2025.

KEANE, J. A.; EALY, A. D. An Overview of Reactive Oxygen Species Damage Occurring during *In Vitro* Bovine Oocyte and Embryo Development and the Efficacy of Antioxidant Use to Limit These Adverse Effects. **Animals**, v. 14, n. 2, p. 330-330, 21 jan. 2024.

KHAN, I. M. et al. Impact of Cryopreservation on Spermatozoa Freeze-Thawed Traits and Relevance OMICS to Assess Sperm Cryo-Tolerance in Farm Animals. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 25 fev. 2021.

LIU, Z.; FOOTE, R. L.; BROCKETT, C. D. Survival of Bull Sperm Frozen at Different Rates in Media Varying in Osmolarity. v. 37, n. 3, p. 219-230, 1 nov. 1998.

MARIANO, R. S. G. et al. Aspiração folicular em ruminantes – **Revisão de Literatura**. **Revista Investigação Medicina Veterinária**, v. 14, n. 6, p. 1-8, 2015.

MARQUES, M. G. et al. Maturação e desenvolvimento embrionário *in vitro* de oócitos bovinos após bloqueio da meiose com inibidores de MPF. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 468, 1 dez. 2011.

MONTEIRO, B. et al. *In vitro* production of bovine embryos using sex-sorted semen from Nelore bulls: effect of sperm concentration, timing, and age of oocytes. **Animal Reproduction**, 2020.

MOREIRA, F. et al. Protocol to Count Cell Number of Preimplantation Embryos using Nuclear Staining with Hoechst 33342 or DAPI. **Laboratory Procedures, PJ Hansen Laboratory - University of Florida**, 2001.

NAZ, R. K.; RAJESH, P. B. Role of tyrosine phosphorylation in sperm capacitation / acrosome reaction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, n. 1, p. 75, 2004.

O'CALLAGHAN, E. et al. Sire contribution to fertilization failure and early embryo survival in cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 6, p. 7262-7271, 2021.

OTERO, R. A.; E DA COSTA, P.; PEREIRA, Emílio. Maturação nuclear *in vitro* de ovócitos bovinos selecionados pelo método azul cresil brilhante. **Revista Colombiana de Ciencia Animal**, v. 9, n. 2, p. 345-354, 2017.

PARRISH, J. J. Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 67-73, jan. 2014.

PINTUS, E.; ROS-SANTAELLA, J. L. Impact of oxidative stress on male reproduction in domestic and wild animals. **Antioxidants**, 2021.

PRADO, R. B. et al. Effect of different bovine semen extenders on *in vitro* development of bovine embryos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p. 1118-1126, 2012.

RIBEIRO, V. H. A. et al. Avaliação da qualidade do sêmen bovino criopreservado com diluidores de origem animal e vegetal. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 10, p. 66182-66190, 6 out. 2022.

SALISBURY, G. W.; VANDEMARK, N. L.; LODGE, J. R. Physiology of reproduction and artificial insemination of cattle. 2. ed. San Francisco: W.H. Freeman and Company, 1978.

SALVADOR, D. F.; NOGUEIRA, L. A. G.; SALVADOR, S. C. Aplicações e limites dos testes de Integridade Acrossômica e Reação Acrossômica Induzida por heparina para touros da raça Nelore. **Boletim de Indústria Animal**, v. 76, p. 1-9, 2019.

SAUNDERS, C. M. et al. PLC ζ : a sperm-specific trigger of Ca²⁺ oscillations in eggs and embryo development. **Development**, v. 129, n. 15, p. 3533-3544, 1 ago. 2002.

SENGUPTA, P. et al. Oxidative stress affects sperm health and fertility—Time to apply facts learned at the bench to help the patient: Lessons for busy clinicians. **Reproductive Medicine and Biology**, v. 23, n. 1, 1 jan. 2024.

SIGNORELLI, J.; DIAZ, E. S.; MORALES, P. Kinases, phosphatases and proteases during sperm capacitation. **Cell and Tissue Research**, v. 349, n. 3, p. 765-782, 1 set. 2012.

- SILVA, G. P. et al. Diagnóstico de gestação em vacas submetidas a IATF com sêmen resfriado adicionado de um extrato natural. In: **SIMPÓSIO SUL DE REPRODUÇÃO APLICADA EM BOVINOS, 2023, Instituto Federal Catarinense**. Anais do Simpósio Sul de Reprodução Aplicada em Bovinos. Instituto Federal Catarinense, 2023. v. 1.
- SILVA, N. C. et al. Effect of different cryopreservation extenders added with antioxidants on semen quality and *in vitro* embryo production efficiency in cattle. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 93, p. e20191229, 2021.
- SILVA, N. C. et al. Efeito da adição de diferentes antioxidantes em diluentes de criopreservação sobre a qualidade do sêmen e a produção *in vitro* de embriões bovinos. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e751985125, 30 jul. 2020.
- SILVA, P. F. N.; GADELLA, B. M. Detection of damage in mammalian sperm cells. **Theriogenology**, v. 65, n. 5, p. 958-978, mar. 2006.
- SIMÕES, R. et al. Qualidade da cromatina espermática e sua implicação no desenvolvimento embrionário inicial de bovinos. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 3, p. 18-35, 2014.
- SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M. T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v. 132, p. 342-350, 2020.
- SUZUKI, R. et al. Morphokinetic analysis of pronuclei using time-lapse cinematography in bovine zygotes. **Theriogenology**, v. 166, p. 55-63, 2021.
- SWANN, K. et al. PLC ζ (zeta): a sperm protein that triggers Ca²⁺ oscillations and egg activation in mammals. In: Seminars in Cell & Developmental Biology. **Academic Press**, 2006. p. 264-273.
- TORRALVO, J. D. et al. Seminal plasma influences oxidative status and post-thaw quality of bovine epididymal sperm. **Ciência Rural**, v. 55, p. e20240182, 2025.
- TRENKEL, C. K.G. Sêmen bovino congelado e descongelado acrescido de extrato natural (NP), com potencial antioxidante. 2023. 43. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Saúde, Bem-Estar e Produção Animal Sustentável) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Realeza, 2023.
- UZUN, K. N. et al. Comparison of the rates for reaching the blastocyst stage between normal and abnormal pronucleus embryos monitored by a time-lapse system in IVF patients. **Journal of the Turkish German Gynecological Association**, v. 22, n. 2, p. 120, 2021.
- VALENCIA, C. et al. Combined Exogenous Activation of Bovine Oocytes: Effects on Maturation-Promoting Factor, Mitogen-Activated Protein Kinases, and Embryonic Competence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 21, p. 15794, 2023.

VIANA, J. H. M. et al. A historical perspective of embryo-related technologies in South America. **Animal Reproduction**, v. 15, n. 1, p. 963-970, 2018.

VIANA, J. H. M. et al. Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (*Bos indicus*) of cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 84, n. 1-2, p. 1-12, 2004.

VIEIRA, L. M. et al. Caracterização de extratos antioxidantes de noz pecã (*Carya illinoensis*) obtidos por tecnologia limpa. In: **Avanços em Ciência e Tecnologia de Alimentos-Volume 2**. Editora Científica Digital, 2020. p. 55-72.

VILLASANTE, J. et al. Evaluation of non-extruded and extruded pecan (*Carya illinoensis*) shell powder as functional ingredient in bread and wheat tortilla. **LWT**, v. 160, p. 113299, abr. 2022.

WALTERS, A. H. et al. Assessment of pronuclear formation following *in vitro* fertilization with bovine spermatozoa obtained after thermal insulation of the testis. **Theriogenology**, v. 65, n. 6, p. 1016-1028, 2006.

WALTERS, J. et al. Oxidative Stress in the Male Germline: A Review of Novel Strategies to Reduce 4-Hydroxynonenal Production. **Antioxidants**, v. 7, n. 10, p. 132, 3 out. 2018.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60-61, p. 481-492, jul. 2000.

YÁNEZ-ORTIZ, I. et al. Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. **Animal Reproduction Science**, v. 246, p. 106904, dez. 2021.

YANG, Y. et al. The regulation role of calcium channels in mammalian sperm function: a narrative review with a focus on humans and mice. **PeerJ**, v. 12, p. e18429-e18429, 25 out. 2024.

ANEXO I

MEIOS BASE PARA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

Meio de Lavagem de Oócitos (TCM 199 Hepes)

Solução Mãe TCM 199 Hepes	10mL	50mL	100mL
Água Milli-Q	10mL	50mL	100mL
TCM 199	0,095g	0,475g	0,950g
Bicarbonato de Sódio (5mM)	0,0044g	0,022g	0,044g
Hepes Sódico (10mM)	0,026g	0,130g	0,260g
Hepes Ácido (10mM)	0,024g	0,120g	0,240g
Piruvato de sódio (100mM)	20µL	100µL	200µL
Sulfato de amicacina (16,67µg/µL)	50µL	250µL	500µL
SFB 10%	1mL	5mL	10mL

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até um mês.

Meio de Maturação de Oócitos (TCM 199 Bicarbonato)

Solução Mãe TCM 199 Bicarbonato	10mL	20mL	50mL
Água Milli-Q	10mL	20mL	50mL
TCM 199	0,095g	0,190g	0,475g
Bicarbonato de Sódio (26mM)	0,022g	0,044g	0,11g
SFB 10%	1,0mL	2,0mL	5,0mL
Piruvato de sódio (100mM)	20µL	40µL	200µL
Sulfato de amicacina (16,67µg/µL)	50µL	100µL	250µL
FSH Foltropin (400mg = 25ml de PBS)	10µL	20µL	50µL
LH (Profasi® (2000UI = 0,01g de hCG)	100µL	200µL	500µL
Estradiol 17β (0,001g para 1,0 mL Etanol)	10µL	20µL	50µL

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até um mês.

Solução TL-Stock e TL-Sêmen

Componentes	TL-Stock	TL-Sêmen	TL-Stock	TL-Sêmen
	25mL		50mL	
Água Milli-Q	25mL	25mL	50mL	50mL
NaCl (114mM/100mM)	0,166g	0,145g	0,333g	0,291g
KCl (3mM/3mM)	0,006g	0,00575g	0,012g	0,0115g
MgCl ₂ -6H ₂ O (0,5mM/0,4mM)	0,002g	0,002g	0,005g	0,004g
NaH ₂ PO ₄ -Anidro (0,3mM)	0,00117g	0,0010g	0,00235g	0,0020g
Bicarbonato de Sódio (25mM)	0,0525g	0,0525g	0,105g	0,105g
CaCl ₂ -2H ₂ O (2mM)	0,0075g	0,0075g	0,015g	0,015g
DL-Ácido Lático (60%) (12mM/26mM)	35,7µL	77,5µL	71,5µL	155µL
<i>Phenol Red</i> (30µM)	0,0003g	0,0003g	0,0005g	0,0005g
Hepes Ácido (10mM)	-	0,0595g	-	0,119g

Ajustar o pH para 7,4 com gás (5% de CO₂) durante 1 minuto. Adicionar os componentes na ordem em que aparecem e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

Meio FIV-Gotas

Componentes	4mL	8mL	12mL
TL-Stock	3,6mL	7,2mL	10,8mL
Sulfato de amicacina (16,67µg/µL)	20µL	40µL	60µL
Piruvato de sódio (100mM)	8µL	16µL	24µL
PHE (solução)	160µL	320µL	480µL
Heparina (176UI/mg, 3mg em 1mL)	40µL	80µL	120µL
BSA (FIV) (6mg/mL)	0,024g	0,048g	0,072g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm e armazenar em geladeira (4°C), por até um mês.

Solução de Percoll 90%

Componentes	2 mL	4 mL	6 mL	8 mL
Percoll	1,8mL	3,6mL	5,4mL	7,2mL
Solução 10X	200µL	400µL	600µL	800µL
CaCl ₂ (Estoque de 1M)	4µL	8µL	12µL	16µL
MgCl ₂ (Estoque de 100mM)	7,8µL	15,6µL	23,4µL	31,2µL
DL-Ácido Lático (60%) (26,4mM)	7,4µL	14,8µL	22,2µL	29,6µL
Bicarbonato de Sódio (20mM)	0,0042g	0,0084g	0,0126g	0,0168g

Obs: adicionar os componentes na ordem em que aparecem, sob agitação constante, e homogeneizar bem antes de adicionar o bicarbonato, pois o ácido lático fica depositado no fundo do frasco.

Solução 10X para Percoll

Componentes	5mL	10mL
Água Milli-Q	5mL	10mL
KCl (Estoque de 1M) (Uso 31mM)	0,1545mL	0,309mL
NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O (Estoque de 100mM) (Uso 3mM)	0,146mL	0,292mL
NaCl (800mM)	0,233g	0,4675g
Hepes Ácido (50mM)	0,060g	0,119g
Hepes Sódico (50mM)	0,065g	0,130g

Adicionar os elementos na ordem em que aparecem, filtrar em membrana de 0,22µm, aliquotar em microtubo de 0,5mL, com 210µL cada, e armazenar em Freezer (-70°C), por até 6 meses.

Meio SOF

Soluções Estoque	A Solução de Sais	B Solução de Bicarbonato	C Solução de Piruvato	D Solução de CaCl₂	L-Glutamina
Água Milli-Q	9,84mL	10mL	500µL	1mL	1mL
NaCl (1,1M)	0,629g	-	-	-	-
KCl (72mM)	0,0534g	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄ (12mM)	0,0162g	-	-	-	-
MgSO ₄ -7H ₂ O (7,4mM)	0,0182g	-	-	-	-
DL-Ácido Lático (60%) (50µM)	60µL	-	-	-	-
Bicarbonato de Sódio (250mM)	-	0,210g	-	-	-
<i>Phenol Red</i> (260µM)	-	0,001g	-	-	-
Piruvato Sódico (100mM)	-		0,0055g	-	-
CaCl ₂ -2H ₂ O (178mM)	-	-	-	0,0262g	-
L-Glutamina (200mM)	-	-	-	-	0,02923g

Adicionar os componentes na ordem em que aparecem e armazenar em geladeira (4°C). Os estoques A, B, D e L-Glutamina devem ser preparadas semanalmente, mas o estoque C, diariamente.

SOF estoque	20mL	40mL
Água Milli-Q	15,6mL	31,2mL
Estoque A	2mL	4 mL
Estoque B	2mL	4 mL
Estoque D	200µL	400µL
L-Glutamina	20µL	40µL
BME Essenciais (50X)	200µL	400µL
MEM Não-Essenciais (100X)	200µL	400µL
Myo-Inositol (2,8mM)	0,01g	0,02g
Tri-Citrato de Sódio Di-Hidratado (340µM)	0,002g	0,004g

Adicionar os componentes na ordem e armazenar em geladeira (4°C), por até uma semana.

Meio SOF final (SOF estoque + 2,5% de SFB+ 6mg BSA/mL):

SOF final	1mL	5mL	6mL	10mL
SOF estoque	968 μ L	4,84mL	5,81mL	9,68mL
Piruvato de sódio (100mM)	2 μ L	10 μ L	12 μ L	20 μ L
Sulfato de amicacina (16,67 μ g/ μ L)	5 μ L	25 μ L	30 μ L	50 μ L
BSA (CIV) (6mg/mL)	0,005g	0,025g	0,030g	0,05g
SFB (2,5%)	25 μ L	125 μ L	150 μ L	250 μ L

Adicionar o BSA por último, esperar dissolver, filtrar em membrana de 0,22 μ m equilibrar em atmosfera gasosa e estocar em refrigeração por até uma semana