

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EFEITOS DA FERTILIDADE PATERNA NA CINÉTICA E QUALIDADE DE
EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

Discente: Taynara dos Santos Santana

Aquidauana/ MS

Dezembro 2025

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

EFEITOS DA FERTILIDADE PATERNA NA CINÉTICA E QUALIDADE DE
EMBRIÕES PRODUZIDOS *IN VITRO*

Discente: Taynara dos Santos Santana

Orientador (a): Profa. Dra. Fabiana de Andrade Melo
Sterza

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências par a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Aquidauana/ MS

Dezembro 2025

S223e Santana, Taynara dos Santos

Efeito da fertilidade paterna na cinética e qualidade de embriões produzidos *in vitro*/ Taynara dos Santos Santana. – Aquidauana, MS: UEMS, 2025.
54 p.

Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Zootecnia – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 2025.

Orientadora: Profa. Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza

1. Fertilidade de touros. 2. Cinética. 3. PIVE. 4. Lipídios. I. Título. II. Sterza, Fabiana de Andrade Melo

CDD 23. ed. - 636.2082

Ficha Catalográfica elaborada pela bibliotecária da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul (UEMS)

Susy dos Santos Pereira CRB1°1783

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM PRODUÇÃO ANIMAL**

TAYNARA DOS SANTOS SANTANA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal, como requisito para obtenção do grau de Mestra em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 18/12/2025.

Documento assinado digitalmente
gov.br FABIANA DE ANDRADE MELO STERZA
Data: 22/12/2025 14:45:13-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza (Orientadora)

Dra. Mirela Brochado Souza, UFSCAR
(participação via videoconferência)

Dra. Ligiane De Oliveira Leme, USP
(participação via videoconferência)

"Mas é preciso ter força, é preciso ter raça
É preciso ter gana sempre
Quem traz no corpo a marca, Maria, Maria
Mistura a dor e a alegria

Mas é preciso ter manha, é preciso ter graça
É preciso ter sonho sempre
Quem traz na pele essa marca possui
A estranha mania de ter fé na vida."
— Milton Nascimento, *Maria, Maria*

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho, com toda a minha gratidão e amor, a **minha família e ao meu companheiro de vida**, que sempre acreditou em mim e me apoiou incondicionalmente nos momentos de desafios e conquistas, aqueles que mesmo distantes, se fizeram presente em cada pensamento e oração. A **todos os meus amigos** que compartilharam alegrias, palavras de incentivo e os dias difíceis. Que este esforço seja um reflexo do carinho, fé e perseverança, que sempre me acompanharam em toda jornada!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser meu sustento e fortaleza em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus pais, que mesmo sem entenderem exatamente o que é um mestrado, me apoiaram incondicionalmente. Mãe, suas orações foram meu sustento. Pai, mesmo diante da saudade e das lágrimas de cada despedida, obrigada por acreditar e me incentivar. Ouvir de vocês: *“a gente não entende dessas coisas, mas se for bom pra você, faça”* me mostrou que este título carrega não apenas os meus sonhos, mas também o amor e a confiança que vocês depositaram em mim.

A minha irmã e ao meu sobrinho, por sempre me aguardarem entusiasmados, enchendo meus retornos de alegria.

Ao meu namorado e parceiro, obrigada por ser meu porto seguro, por me acolher nas angústias, celebrar cada vitória e estar ao meu lado em todas as fases desta jornada.

Aos meus amigos da pesquisa, Micheline, Wallery, Juliano e Maria Carla, que com bom humor (meio ácido as vezes kkkk) e companheirismo transformaram dias pesados em risos. Compartilhar essa etapa com vocês tornou tudo mais suportável e muita das vezes, divertidos.

A minha amiga, mais que especial Micheline, que acompanhou cada passo do experimento e que sempre fazia questão de perguntar: *“E aí, deu certo?”*, ouvindo cada detalhe, muitas vezes sem entender nada (kkkk). Amiga seu apoio foi mais que importante, foi essencial.

A minha dupla, Wallery, por enfrentar comigo tantos perrengues e mesmo nos dias mais difíceis, sempre me colocava para cima. Ter você ao meu lado fez toda a diferença.

A minha querida orientadora, que mesmo com tantas demandas, sempre tão paciente, me ouviu, orientou e ensinou. Ter você como guia nesta jornada foi uma verdadeira sorte.

Ao professor José Sprícigo e a todo o grupo NEBRA, pela recepção calorosa e apoio fundamental em uma etapa importante deste trabalho. E o professor Erikliis Nogueira, pelo auxílio na seleção dos touros.

Ao pós- doc. William, pela paciência, tempo e dedicação em me auxiliar com a parte estatística deste estudo.

Ao meu grupo de pesquisa, GENTRA pelas coletas de frigorífico e auxílio nas aspirações.

A agência de fomento CNPq (Processo nº 421687/2021-5) pela concessão do recurso financeiro necessários para a realização desse estudo.

A todos que de alguma forma, fez parte desta trajetória: meu mais sincero e profundo obrigada!!

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	11
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS.....	12
2.2. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE DE BOVINOS	15
2.2 FERTILIDADE DE TOUROS.....	18
2.3 CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS.....	20
2.4 METABOLISMO LIPÍDICO DE EMBRIÕES BOVINOS.....	21
3. OBJETIVO GERAL	24
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
CAPÍTULO 2 – EFEITO DA FERTILIDADE PATERNA NA CINÉTICA EMBRIONÁRIA E ACÚMULO LIPÍDICO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS <i>IN VITRO</i>.....	33
RESUMO	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3. RESULTADOS.....	38
4. DISCUSSÃO	42
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
CAPÍTULO 3 – ARTIGO TÉCNICO	49
CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	54

RESUMO

Esta dissertação foi organizada em quatro capítulos. O Capítulo 1 apresenta a revisão bibliográfica sobre a produção *in vitro* de embriões (PIVE) e os efeitos paternos no desenvolvimento embrionário. O Capítulo 2 contém um artigo científico que avaliou, em condições controladas, a influência da fertilidade de touros sobre parâmetros espermáticos, cinética de clivagem, desenvolvimento embrionário e conteúdo lipídico de blastocistos produzidos *in vitro*. O Capítulo 3 apresenta dados comerciais de PIVE, complementando e fortalecendo as conclusões obtidas experimentalmente. O Capítulo 4 reúne as considerações finais. No estudo experimental (Capítulo 2), touros de centrais de sêmen foram classificados conforme suas taxas de prenhez em IATF (precisão BIF > 24%): >55% como alta fertilidade (AF) e <40% como baixa fertilidade (BF). Cinco touros por grupo foram avaliados em três repetições. Um total de 1.500 oócitos grau 1 e 2 foi utilizado nas etapas de maturação, FIV e CIV com meio comercial (Cenatte®). Foram fertilizados 740 oócitos com sêmen AF e 760 com sêmen BF; após seleção em Percoll, motilidade e vigor foram semelhantes entre grupos (P = 0,47). A clivagem não diferiu, porém, touros BF produziram mais embriões lentos (≤ 6 células no D4) (P = 0,0038). As taxas de blastocisto no D7 foram similares (AF = 27,6%; BF = 25,5%). Em 79 blastocistos expandidos avaliados, o número de células não diferiu, mas o conteúdo lipídico foi maior em embriões BF (P = 0,0005), indicando alterações metabólicas que podem comprometer sua viabilidade, especialmente após criopreservação. Assim, a seleção de embriões rápidos (≥ 8 células em D4) pode ser útil para touros BF. No Capítulo 3, foram analisados dados comerciais da Cenatte Embriões®, envolvendo 54 touros, 376 doadoras e 6.576 oócitos. Os touros foram classificados como BF (25 touros; 44–54%) ou AF (29 touros; 58–63%). As taxas de produção embrionária foram semelhantes (P = 0,6124). Dentro dos grupos, houve grande variabilidade: no BF, 8 touros tiveram baixo desempenho (média 20,5%) e 17 apresentaram $\geq 41\%$ (média 42,8%); no AF, 10 touros tiveram baixa produção (média 21,6%) e 19 exibiram desempenho elevado (média 48,6%). O Capítulo 4 conclui que a fertilidade paterna não altera a taxa de blastocisto, mas pode influenciar o metabolismo embrionário. A seleção de embriões rápidos pode melhorar a escolha de blastocistos com menor conteúdo lipídico, especialmente em touros de baixa fertilidade.

Palavras-chave: Fertilidade de touros, Cinética, PIVE, Lipídios.

ABSTRACT

This dissertation is organized into four chapters. Chapter 1 presents a literature review on in vitro embryo production (IVEP) and paternal effects on embryonic development. Chapter 2 contains a scientific article that evaluated, under controlled conditions, the influence of bull fertility on sperm parameters, cleavage kinetics, embryonic development, and lipid content of blastocysts produced in vitro. Chapter 3 presents commercial data on IEP, complementing and strengthening the conclusions obtained experimentally. Chapter 4 brings together the final considerations. In the experimental study (Chapter 2), bulls from semen centers were classified according to their pregnancy rates in IATF (BIF accuracy > 24%): >55% as high fertility (HF) and <40% as low fertility (LF). Five bulls per group were evaluated in three replicates. A total of 1,500 grade 1 and 2 oocytes were used in the maturation, IVF, and ICSI stages with commercial medium (Cenatte®). A total of 740 oocytes were fertilized with AF semen and 760 with LF semen; after selection in Percoll, motility and vigor were similar between groups ($P = 0.47$). Cleavage did not differ, however, LF bulls produced more slow embryos (≤ 6 cells on D4) ($P = 0.0038$). Blastocyst rates on D7 were similar (HF = 27.6%; LF = 25.5%). In 79 expanded blastocysts evaluated, the number of cells did not differ, but the lipid content was higher in LF embryos ($P = 0.0005$), indicating metabolic changes that may compromise their viability, especially after cryopreservation. Thus, the selection of fast embryos (≥ 8 cells on D4) may be useful for LF bulls. In Chapter 3, commercial data from Cenatte Embriões® were analyzed, involving 54 bulls, 376 donors, and 6,576 oocytes. Bulls were classified as LF (25 bulls; 44–54%) or AF (29 bulls; 58–63%). Embryo production rates were similar ($P = 0.6124$). Within the groups, there was great variability: in LF, 8 bulls had low performance (mean 20.5%) and 17 had $\geq 41\%$ (mean 42.8%); in HF, 10 bulls had low production (mean 21.6%) and 19 exhibited high performance (mean 48.6%). Chapter 4 concludes that paternal fertility does not alter the blastocyst rate but may influence embryonic metabolism. The selection of fast embryos may improve the choice of blastocysts with lower lipid content, especially in low-fertility bulls.

Keywords: Bull fertility, Kinetics, IVF, Lipids

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A inseminação artificial e a Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE), tem impulsionado cada vez mais a produtividade e a sustentabilidade da pecuária. A inseminação artificial é uma técnica amplamente difundida. Prova disso é que no ano de 2024 cerca de 23,2% milhões de protocolos foram comercializados e no primeiro semestre de 2025, cerca de 10,9 milhões de doses de sêmen foram vendidas (Barusselli, 2025).

Enquanto a PIVE tem crescido exponencialmente, os dados do IETS (2024) mostram que houve o aumento de 15,8% no mundo e 3,1% no Brasil em 2023. A PIVE revoluciona a pecuária, pois permite a multiplicação em larga escala de material genético superior, promovendo avanços significativos na qualidade e na produtividade dos rebanhos, por isso tem sido utilizada como ferramenta estratégica.

A PIVE também permite a criação de bancos de germoplasma, os quais desempenham papel essencial na conservação e regeneração de espécies em risco de extinção, além de possibilitar o aproveitamento de fêmeas jovens, gestantes ou com problemas de fertilidade adquirida, consolidando-se como uma ferramenta estratégica para o aumento da eficiência reprodutiva e aceleração do ganho genético por meio da redução do intervalo entre gerações.

No entanto, a técnica de PIVE ainda apresenta muitos gargalos, como as condições inadequadas para maturação e fertilização, que mesmo comumente se mostrando acima de 70%, acabam refletindo no desenvolvimento adequado no cultivo do embrião, acarretando taxas de 20 a 40% (Hansen, 2024). E para o sucesso das biotecnologias, múltiplos fatores devem ser observados, dentre eles a fertilidade do touro, que por muitas vezes acaba sendo considerada secundária no desenvolvimento embrionário. Há pouco tempo, acreditava-se que o único papel do espermatozóide era contribuir com o genoma haploide, porém, atualmente já está claro que o espermatozoide impacta em todo o desenvolvimento embrionário (Lima; Souza, 2009).

Na PIVE, a capacitação espermática é induzida pela heparina (Parrish 2014), porém esse estímulo pode não reproduzir integralmente as modificações fisiológicas promovidas *in vivo*, aumentando assim a probabilidade do oócito ser fertilizado por espermatozoides com alterações funcionais, comprometendo a competência embrionária e o seu desenvolvimento subsequente (Koyama et al., 2014).

A utilização de sêmen de touros subfêrteis pode provocar baixas taxas de concepção e desenvolvimento embrionário ineficiente, resultando em significativas perdas produtivas e econômicas (Nogueira, 2025). Diante disso, foram desenvolvidos alguns métodos como o desenvolvido pela *Beef*

Improvement Federation (BIF), que é uma medida conservadora que utiliza modelos estatísticos para avaliar a precisão das estimativas de fertilidade (Golden, 2021).

Através de avaliações, como a BIF, e a fim de minimizar o efeito do touro na IATF foram criados os selos de fertilidade de acordo com a taxa de prenhez a campo. No entanto, não há selos similares para selecionar o touro para a FIV, porém, de acordo com a experiência dos laboratórios comerciais, os resultados entre a fertilidade *in vivo* e *in vitro* variam entre si. Um dos motivos é o fato do preparo prévio do sêmen antes da FIV, quando é feita seleção dos melhores espermatozoides e ajuste de dose, considerando características como motilidade, vigor e concentração. No entanto, esse ajuste não garante o sucesso da fecundação (Hansen et al., 2010).

São escassos os trabalhos que buscam esclarecer os mecanismos que influenciam esse processo. Essa lacuna, dificulta a aplicação mais eficiente das biotecnologias. Diante disso, torna-se necessário compreender melhor como a fertilidade determinada a campo impacta o desenvolvimento embrionário *in vitro*

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotecnologia reprodutiva que permite a fecundação do oócito pelo espermatozoide fora do trato reprodutivo da fêmea, permitindo o desenvolvimento do embrião até o estágio de blastocisto, quando pode ser transferido para uma fêmea receptora. Os primeiros relatos da técnica ocorreram em 1877, mas somente em 1959 foi descrito o primeiro nascimento em coelhos. No final dos anos 70 houve diversos relatos da boa aplicação da PIVE, com nascimento de ratos e camundongos saudáveis, o que gerou ainda mais interesse dos pesquisadores. Em animais de produção, os primeiros relatos ocorreram na década de 80 e em 1982 nasceu primeiro bezerro proveniente da fertilização *in vitro* (Brackett et al., 1982) e nesta mesma década também foi relatada a possibilidade de que todo o desenvolvimento inicial de um embrião poderia ser realizado *in vitro*. No Brasil a PIVE de bovinos teve início em 1990 e os primeiros nascimentos ocorreram em 1994.

2.1.2. Etapas da técnica no laboratório

A obtenção dos oócitos pode ser realizada *post mortem*, através da coleta de ovários em abatedouros e punção de seus folículos ou através da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom – *Ovum Pick Up* (OPU) (Vagaro et al., 2008). E para que o oócitos possam estar aptos a fecundação e ter a maior chance de se tornar um embrião, sua morfologia também deve ser levada em

consideração. O oócito é composto por células do cumulus, corona radiata, zona pelúcida, membrana plasmática, ooplasma/citoplasma, núcleo e nucléolo e baseando-se na homogeneidade das células do cumulus e do ooplasma Leibfried e First (1979) descreveram a classificação, sendo considerados COCs viáveis os de I a III e inviáveis os de IV. Ao apresentar um bom grau de qualidade e completar a maturação nuclear e citoplasmática, o oócito torna-se apto a fecundação.

Portanto, na primeira etapa da PIVE é realizada classificação e seleção adequada dos COCs, que serão levados ao cultivo. Na figura 1 está demonstrada a morfologia dos COCs.

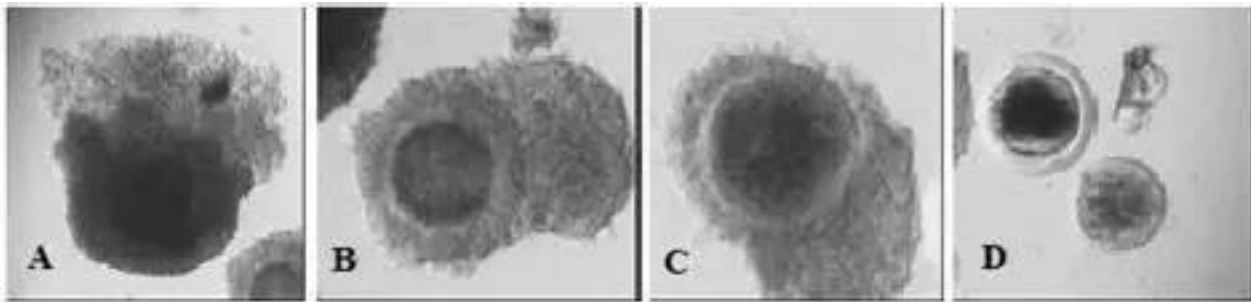


Figura 1 – Morfologia do oócito

Fonte: Stringfellow e Givens (2010)

Grau I: Oócitos com cumulus compactado; mais de três camadas de células; Ooplasma homogêneo de forma que preencha completamente o interior da zona pelúcida

Grau II: Oócitos com menos de três camadas de células do cumulus; ooplasma preenche todo o interior da zona pelúcida.

Grau III: Oócitos que apresentam células do cumulus; ooplasma preenchido de forma irregular.

Grau IV: Oócitos completamente desnudo; ooplasma preenchido de forma irregular e com aspectos apoptóticos.

Em seguida ocorrem as etapas de maturação *in vitro* (MIV), Fertilização *in vitro* (FIV) e Cultivo *in vitro* (CIV).

A MIV é considerada uma das fases mais importantes da PIVE, visto que os oócitos iniciam a meiose ainda na vida fetal, período em que ocorre a primeira parada da meiose, na fase de diplóteno da prófase I, quando é iniciada a separação gradual dos cromossomos homólogos. In vivo, a meiose se reinicia apenas a partir da puberdade, quando ocorre o pico de hormônio luteinizante (LH) e a maturação nuclear final do oócito, caracterizada por atingir a metáfase II com a extrusão do primeiro corpúsculo polar. Nesta fase ocorre a segunda parada da meiose.

A maturação nuclear *in vitro* inicia assim que o oócito é retirado do ambiente folicular e leva de 20 a 24 horas para finalizar (Varago et al., 2008). Além disso o oócito também passa pelo processo de maturação citoplasmática, o qual é um processo mais lento e acontece ao longo do desenvolvimento

folicular, ocasionando assim a reorganização das organelas celulares e muitos outros eventos importantes para o desenvolvimento embrionário (Watson, 2007; Anguita et al., 2007; Picton et al., 1998).

Durante o processo de maturação as células da granulosa e do cumulus expressam genes específicos necessários para sua diferenciação final. Além disso as células do cumulus produzem ácido hialurônico para que ocorra a expansão celular, abrangendo as células em uma matriz mucinosa, sinalizando assim a ocorrência da maturação oocitária (Richards et al., 2002; Sasseville et al., 2009).

Na PIVE, os COCs são maturados por 22-24 horas em meios de maturação, sendo o mais comumente usados o Tissue Culture Medium 199 (TCM 199®), suplementados com vitaminas, antibióticos, aminoácidos, bicarbonato de sódio, estradiol-17 β , FSH, LH, soro fetal bovino (SFB), lactato e piruvato de sódio, em incubadora aquecida a 38,5° C, umidade saturada e atmosfera gasosa contendo 5% de CO₂ (Varago et al., 2008). HEPINEFRINA...

A FIV consiste na incubação de COCs maturados com espermatozoides capacitados em um meio favorável, para que aconteça a fusão das membranas e emparelhamentos dos pró-núcleos, tornando-se assim um zigoto (Oliveira et al., 2014).

Portanto, antes da fecundação in vitro o sêmen precisa ser preparado. Mais comumente o sêmen é preparado por meio do procedimento de centrifugação por imersão ou para transpor o gradiente de diferentes densidades, e esse preparo tem a função de remover os crioprotetores usados no congelamento, resíduos, plasma seminal e espermatozoides mortos, resultando assim apenas os espermatozoides móveis (Ferré et al., 2020).

Dentre os métodos de preparação o Percoll é o mais utilizado, e consiste na seleção dos espermatozoides através de gradiente de densidade. O Percoll é composto por sílica coloidal estabilizado com sódio e para evitar a toxicidade, as partículas são dissociadas e revestidas por Polivinilpirrolidona (PVP) (Pertoft, 2000). Após a amostra de sêmen ser colocada sobre o gradiente de Percoll e submetida a primeira centrifugação, os espermatozoides passam por uma segunda centrifugação junto a um novo meio, a fim de limpá-los e nutri-los.

Os COCs juntamente aos espermatozoides são colocados em meio de fecundação in vitro contendo heparina, cálcio, ionóforos, hipotaurina, epinefrina, albumina sérica bovina (BSA) e antibiótico (Gimenes et al., 2015; Ferré et al., 2020). Epinefrina e Hipotaurina tem a função de melhorar o ambiente embrionário e aumentar as chances de sucesso da fertilização, enquanto a heparina provoca reações bioquímicas na membrana plasmática do espermatozoide, auxiliando em sua capacitação (Miller et al., 1994; Assumpção et al., 2002). Essa etapa acontece em incubadoras umidificadas a 38,5°C e 5%

de CO₂ e tem a duração de 18 a 22 horas (Gordon, 2003; Savannah et al., 2023).

A baixa tensão de oxigênio (5% de oxigênio) durante todas as etapas da produção (MIV, FIV e CIV) já são utilizadas e relatadas na literatura. Em humanos foi observado que a cultura dos oócitos na fase de MIV em baixa tensão, melhora significativamente sua morfologia (Boumerdassi, et al., 2024) assim como Lee et al., (2025) que ao cultivar oócitos de camundongo, em baixa tensão, no momento da fecundação, identificou um favorecimento das vias metabólicas associadas a reprogramação embrionária. Em bovinos, a utilização da baixa tensão para o amadurecimento e fertilização dos oócitos já demonstrou melhora na competência dos oócitos e criotolerância aprimorada (Báez et al., 2021).

A fase de CIV, é a fase mais longa da produção *in vitro*, podendo durar até 9 dias, e nesse período utiliza-se a baixa tensão, a fim de simular de forma mais próxima o ambiente fisiológico do trato reprodutivo (Sciorio; Smith., 2019). Espera-se com isso produzir embriões de melhor qualidade e chance de prenhez.

O estágio embrionário é avaliado através do tamanho, número e grau de compactação dos blastômeros, formação do blastocele, espessura da zona pelúcida e espaço ocupado pelo botão embrionário. A primeira avaliação ocorre no terceiro dia, onde avalia-se a clivagem dos zigotos, predizendo assim a taxa de fertilização (Ferré et al., 2020). No sétimo dia avalia-se a taxa de blastocisto e no nono dia a taxa de eclosão, afirmando assim o sucesso da produção (Savannah et al., 2023).

2.2. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO PRECOCE DE BOVINOS

O desenvolvimento embrionário inicia-se após a fertilização, que é o processo pelo qual o oócito e espermatozoide se unem. Os pronúcleos masculino e feminino são formados logo após a fusão, concluindo assim a meiose. Os pronúcleos aumentam de tamanho, os envelopes nucleares são degradados e a singamia acontece, processo que se caracteriza pela união dos pronúcleos, formando assim o Zigoto (Wright, 1999). A primeira divisão do ciclo celular em mamíferos, acontece após 18-36 horas e as divisões subsequentes ocorrem a cada ~ 12-24 horas (Jukam; Shariati; Skotheim, 2017)

Nas primeiras clivagens o embrião utiliza RNAs e proteínas maternas, que são armazenados no oócito durante a oogênese (Schulz e Harrison, 2019). O macho também participa dessa fase e seu papel vai além de apenas doar o seu material genético. Ostermeier et al. (2004), identificaram que o espermatozoide transfere RNAs mensageiros (mRNAs) e pequenos RNAs codificantes para o oócito, no momento da fecundação. A princípio acreditou-se que eram apenas de um material residual de outras células presentes no ejaculado, sem função alguma (Miller et al., 2005). No entanto, Boerke et al., (2007) demonstraram que os RNAs dos espermatozoides, junto com os centríolos e fatores de ativação, que são inseridos no momento da fecundação permanecem estáveis até a ativação do genoma embrionário

(EGA). Ostermeier et al. (2004) relataram pela primeira vez que os mRNA paternos permanecem intactos por aproximadamente 3 horas após a fertilização e não são encontrados em oócitos não fecundados. Sendo assim, acredita-se que os RNAs dos espermatozoides estão envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial (Miller, 2007).

Impulsionado pelo complexo proteico BTG4-CCR4-NOT (CNOT7), 75% dos mRNAs oriundos da mãe são degradados em um evento denominado decaimento M, que ocorre desde a maturação do oócito, logo após a quebra da vesícula germinativa e vai até o estágio de metáfase II. Caso essa degradação não aconteça ou atrase, ocorre o acúmulo excessivo de mRNA, dificultando o metabolismo e afetando negativamente o desenvolvimento do zigoto (Yu et al., 2016). Após a fecundação inicia-se o decaimento Z, que é a degradação dos 25% mRNAs restantes, oriundos da mãe e o início da transição materno-zigótica (MZT), período em que o embrião começa a produzir seus próprios RNAs (Jukam; Shariati; Skotheim, 2017).

Alguns autores relatam que a EGA ou transição materno-zigótica (MZT), em bovinos, ocorre entre os estágios de 8 a 16 células (Hyttel et al., 1996; Plante et al., 1994), no entanto Jiang et al., (2014), demonstraram que a ativação do EGA ou MZT acontece na transição de 4 a 8 células, visto que o maior número de genes diferencialmente expressos é encontrado nessa fase. Essa fase é considerada uma fase crítica no desenvolvimento, visto que nesse momento o embrião pode sofrer um bloqueio em seu desenvolvimento.

Após superar os desafios da AGE e atingir 16 células, o embrião se torna uma mórula (Chen et al., 2010). Essa fase acontece aproximadamente 4 dias após a fecundação, quando o embrião adentra ao útero (Lonergan et al., 2016). Nesta fase, as células embrionárias, chamadas de blastômeros, se tornam difíceis de se distinguir uma das outras. Quanto mais blastômeros essa mórula gera, mais compacta essa “massa” de blastômeros vai se tornando. Essa compactação é importante para estabelecer a polaridade apical-basal do embrião, criando um grupo externo, que originará o trofotoderma (TE) e um grupo interno de blastômeros que se tornarão a massa celular interna (MCI). Essa diferenciação é regulada pelas redes transcricionais CDX2, GATA3, Eomes e o TEAD4 no TE, enquanto OCT4, Nanog e o SOX2, fazem a regulação da MCI (Home et al., 2009).

A partir da definição das áreas TE e MCI, o embrião se caracteriza como blastocisto, 7 dias após a fecundação (Gopichandran e Leese, 2003). Nesse processo, através da ativação da proteína RhoA, ocorre a indução da polarização do citoesqueleto, por meio dos filamentos de actina e o recrutamento do complexo Par3-Par6-aPKC para a região apical das células responsáveis pelo TE (Zhu et al., 2017). Enquanto a E-caderina, proteína de adesão celular, é essencial na compactação e no estabelecimento da

polaridade (Stephenson et al., 2010), o complexo Par3-Par6-aPKC promove a formação de junções oclusivas, e que são de extrema importância para o embrião, visto que formam uma barreira parcialmente impermeável, protegendo que as áreas críticas sejam acessadas por moléculas indesejadas (Zenker et al., 2018).

A formação do blastocele está diretamente relacionada com a atividade da enzima Na⁺/K⁺ – ATPase. A enzima transporta Na⁺ para dentro do blastocele, criando um gradiente osmótico, favorecendo a entrada de água por osmose, acumulando fluido no interior do embrião (Watson e Barcroft, 2001). Barcroft et al. (2003) demonstraram que aquaporinas também podem atuar nessa função de movimentar os fluidos através do TE, sugerindo que a enzima Na⁺/K⁺ – ATPase, embora importantes, podem não ser absolutamente essenciais para a formação do blastocele e, conseqüentemente, do estágio de blastocisto.

A MCI, se diferencia em dois tipos celulares, sendo eles o epiblasto (EPI) e o endoderma primitivo (PE). O EPI é responsável por originar as três camadas germinativas, ectoderma, mesoderma e endoderma e a partir deles se formará o embrião propriamente dito (Gasperowicz e Natale, 2011), enquanto o PE forma o saco vitelino, responsável por nutrir o embrião nos primeiros dias (Chazaud et al., 2006).

Para que tantos eventos aconteçam o metabolismo embrionário passa por alterações importantes. Inicialmente, antes da AGE, o metabolismo é baixo e dependente da fosforilação oxidativa, a fim de gerar adenosina trifosfato (ATP) (Thompson, 2000). Assim que ocorre a AGE, o aumento da demanda energética acontece de forma progressiva. Ao atingir a fase de mórula observa-se um aumento na atividade metabólica e maior consumo de glicose, piruvato e oxigênio. Esse processo exige uma intensa síntese proteica e atividade de bomba iônica, como Na⁺/K⁺ - ATPase (Lima; Souza, 2009). A produção de ATP pode ocorrer pela via glicolítica ou pela via de fosforilação oxidativa, a qual necessita de oxigênio e produz uma maior quantidade de ATP (Joseph Mckeegan, 2015). A utilização de oxigênio leva a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que pode impactar na qualidade embrionária (Harvey et al., 2002).

O maior consumo de glicose coincide com a máxima expressão de GLUT, facilitadores de transporte de glicose. Alguns estão presentes em todas as fases de desenvolvimento (GLUT -1) (Pantaleon et al., 1997), ou somente são ativados assim que o embrião atinge 8 células (GLUT -2, 3 E 5), enquanto outro somente na fase de blastocisto (GLUT – 8) (Carayannopoulos et al., 2000).

Diante disso, nota-se que o desenvolvimento embrionário é completamente dinâmico e regulado por diversos mecanismos essenciais para garantir o sucesso em todas as etapas, no entanto é importante

discutir como fatores externos, como a fertilidade do macho, pode afetar esses processos e consequentemente a qualidade dos embriões.

2.2 FERTILIDADE DE TOUROS

A palavra fertilidade vem do latim, derivada do termo “*fertilitas*”, que significa “capacidade de produzir ou gerar frutos”. A fertilidade é considerada uma das características mais importantes na eficiência produtiva do rebanho e pode não ser apenas influenciada pela nutrição, idade, genética e manejo dos animais, mas quando consideramos o armazenamento dos espermatozoides para o uso em biotecnologias da reprodução devemos considerar todos os atributos espermáticos (Siqueira et al., 2018).

Para que a reprodução tenha sucesso é necessário que o macho seja púbere, fértil, tenha uma boa libido e habilidade física (Hafez, 2000).

Por muitos anos a fertilidade dos machos foi considerada secundária no desenvolvimento embrionário, acreditando-se que o seu único papel era o de contribuir com o genoma haploide, cabendo ao gameta feminino, todo o controle do desenvolvimento embrionário inicial. Com a identificação do RNA mensageiro (mRNA) transferido do espermatozoide para o oócito, iniciou-se a investigação do papel paterno na fecundação (Ostermeier et al., 2004). Através disso foram identificados fatores e moléculas com potencial funcional na espermatogênese, fertilidade, desenvolvimento embrionário e reguladores da transcrição de genes (Govindaraju et al., 2012).

Para o sêmen bovino descongelado ser considerado apto a reprodução é necessária que apresente motilidade progressiva superior a $\geq 30\%$, vigor ≥ 3 (considerando a escala de 1 a 5), espermatozoides normais $\geq 70\%$ e defeitos maiores $\leq 10\%$ e número aproximado de espermatozoides móveis por palheta de 10×10^6 (CBRA, 2013). Ainda assim, touros que se enquadram nos parâmetros mínimos determinados pelo CBRA, podem apresentar resultados insatisfatórios de fertilidade (Oliveira, 2014; Rodriguez, 2017). Por esse motivo, empresas do setor de melhoramento genético e comercialização de sêmen passaram a adotar programas de avaliação de fertilidade a campo, como o IFERT®, Concept Plus®, Fertility PRO® e SCR (Sire Conception Rate). A utilização desses selos tem como objetivo melhorar os índices de prenhez à IATF, que apesar dos avanços científicos obtidos ao longo dos anos, ainda apresenta taxa média de prenhez estimada entre 40% e 50% (Nogueira, 2019).

Como a fertilidade é multifatorial, é um grande desafio identificar uma característica que justifique totalmente a fertilidade do macho, no entanto, apesar de complexo o componente genético do esperma permite o rastreamento de biomarcadores de fertilidade (Kropp et al., 2017). Além disso a literatura descreve que alguns problemas relacionados a fertilidade do macho podem ser classificados em compensatórios e não compensatórios. Quando a baixa fertilidade é referente a baixa concentração

espermática pode ser corrigida com o ajuste da dose inseminante, e, portanto, trata-se de um problema compensatório. Por outro lado, a concentração alta de defeitos morfológicos não pode ser corrigida, e, portanto, é considerada um problema não compensatório (Saacker et al., 2000). Efeitos compensatórios são especialmente beneficiados nos procedimentos realizados *in vitro*, visto que o sêmen é preparado, através de métodos que reduzem a presença de espermatozoide inviáveis para a fecundação.

No entanto, existem falhas ainda não claramente conhecidas e que não se sabe se podem ser compensadas ou não. Em taurinos, especialmente em bovinos de leite, foram identificadas algumas características que diferenciam touros de alta e baixa fertilidade, Ortega et al., (2018) demonstraram que não há diferença entre touros de alta e baixa fertilidade à campo, classificados pelo SCR, na taxa de clivagem, porém a taxa de blastocistos e o número de células dos blastocistos expandidos foi superior no grupo de alta fertilidade.

Touros de alta e baixa fertilidade de raça Nelore, classificados pelo Concept Plus® não diferiram nas taxas de extrusão do segundo corpúsculo polar, taxa de clivados no quarto dia de desenvolvimento e nem na taxa de blastocistos produzidos no sétimo dia. No entanto, os embriões fecundados com touros de baixa fertilidade a campo apresentaram desenvolvimento inicial mais lento, visto que um menor número de embriões clivados foi identificado 28-30 horas após a FIV (Alves, 2019).

Kropp et al., (2017) também não encontraram diferença estatística nas taxas de clivados e nem nas taxas de blastocistos ao utilizar, touros holandeses de alta e baixa fertilidade de acordo com a SCR, na FIV, mas diferentes perfis transcriptômicos foram encontrados, onde os genes altamente expressos em embriões de touros de alta fertilidade foram mais relacionados a processos metabólicos, afim de garantir que o embrião possa ter energia suficiente e metabolismo equilibrado para se desenvolver corretamente, enquanto os genes mais expressos em embriões de touros de baixa fertilidade foram relacionados a mecanismos de estresses (SLC16A7 e GADD45), podendo indicar que esses embriões poderiam estar sob estresse oxidativo e seu metabolismo desregulado.

Diante dessas observações, torna-se evidente que a fertilidade do touro pode afetar além dos eventos iniciais, processos moleculares fundamentais para o desenvolvimento embrionário, impactando no estabelecimento da gestação. Ao avaliarem a expressão de mRNA de touros com alta e baixa fertilidade, identificou-se 415 genes diferentemente expressos entre os grupos. Os touros de baixa fertilidade apresentaram deficiência em fatores transcricionais e translacionais (Feugang et al., 2010). Alves (2019) demonstrou que miR-216b que atua inibindo os genes responsáveis pela divisão celular, foi o miRNA encontrado em maior quantidade em sêmen e blastocisto provenientes de touros de baixa fertilidade, além de ter sido identificado em alta quantidade em zigotos polispérmicos.

Zang et al., (2024) identificaram 12 tsRNAs, que são pequenos derivados de RNA transportador, em touros de raça leiteira de alta e baixa fertilidade. O tsRNA tRX-Glu-NNN-3811, se expressou mais nos touros de baixa fertilidade e em suas filhas, se mostrando ser um possível gene envolvido em estresse oxidativo e apoptose espermática. O miR-2385-5p, se expressaram mais nos touros de baixa fertilidade e está associado a disfunções mitocondriais que prejudicam a fertilidade. Por outro lado, o miR-98, está relacionado com a possível modulação de vias de sinalização celular, como por exemplo o IGF-1, foi mais expresso nos touros de alta fertilidade.

Apesar dos avanços no entendimento das diferenças entre espermatozóides e embriões oriundos de touros de alta e baixa fertilidade a campo, ainda não há esclarecimento suficiente para dar suporte a tomadas de decisões que maximizem a prenhez à IATF e FIV. Por isso é necessário que mais estudos sejam realizados e o entendimento dos mecanismos básicos que envolvem a concepção e o desenvolvimento embrionário são essenciais.

2.3 CINÉTICA DE DESENVOLVIMENTO DE EMBRIÕES BOVINOS

A avaliação da cinética de desenvolvimento embrionário já vem sendo utilizada em embriões de humanos por muitos anos, através do sistema de incubadoras com *time-lapse*, permitindo assim acompanhar o desenvolvimento do embrião sem a necessidade de retirá-lo do sistema controlado (Gardner; Kelley, 2018). Em bovinos, a avaliação não invasiva pelo *time-lapse* já demonstrou resultados positivos no aumento da taxa de prenhez (Sugimura et al., 2017), mas devido ao elevado volume de trabalho e custo com o equipamento, não atingiu escala comercial.

A técnica tem a capacidade de prognosticar a capacidade de desenvolvimento do embrião e quando correlacionado com a morfologia, permite a elaboração de modelos capazes de correlacionar a cinética com a taxa de prenhez (Bang et al., 2013), se tornando um método de fácil aplicação e que pode aumentar a acurácia na seleção dos embriões.

O desenvolvimento inicial do embrião é marcado por diversas transformações morfológicas e moleculares, no entanto o potencial de desenvolvimento inicial é adquirido do oócito, visto que o estoque de mRNAs e proteínas utilizados nas primeiras divisões são principalmente de origem materna (Zeng e Schultz, 2005). Em humanos os estudos apontam que a velocidade de desenvolvimento do embrião está relacionada ao potencial de implantação. Chamayou et al., (2013) demonstraram que embriões humanos que atingem o estágio de 5 células, menos de 51 horas após a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), possuem maiores probabilidades de implantação. Além disso, estudos também realizados em humanos apontaram que embriões que clivam em até 27 horas após a ICSI geram maior

taxa de gestação, do que aqueles que clivam mais tarde (Fenwick et al., 2002; Salumets et al., 2003).

Embriões que clivam mais rápido, são mais propensos a atingir o estágio de blastocisto (Lonergan et al., 1999), além de apresentarem menores taxas de apoptose (Vandaele et al., 2006). Os embriões de clivagem rápida apresentam maior expressão do gene de metabolismo energético, especificamente o GLUT1 – transportador de glicose, maior expressão do gene de crescimento celular (IGF2) e do gene de desenvolvimento embrionário (OCT4- marcador de pluripotência). Resumidamente os embriões de cinética rápida possuem perfil mais eficiente de metabolismo energético e menor ativação de vias de estresse e apoptose (Gutiérrez-ad et al., 2004). No entanto, a clivagem muito rápida pode gerar danos ao embrião, como a perda de *imprinting* genômico (Market Velker et al., 2012), demonstrando que apesar da maior chance de se tornar blastocisto, não são necessariamente os melhores embriões para transferência (Millazzotto et al., 2016).

Os embriões que clivam mais lentamente apresentam a expressão de genes relacionados ao estresse (HPS70), apoptose e alteração de metabolismo (GLUT3), além de maior atividade da enzima caspase (Vandaele et al., 2006).

Sucintamente, os genes expressos durante a AGE de embriões de clivagem rápida são genes relacionados ao desenvolvimento do embrião, enquanto os de clivagem lenta são genes relacionados a sobrevivência ou morte celular (Ripamonte et al., 2012). No entanto, ainda não foram identificadas diferenças entre as taxas de prenhez ao transferir embrião de clivagem rápida ou lenta em bovinos (Lonergan et al., 1999; Kirkegaard et al., 2013), acreditando-se, portanto, que a falta de algoritmos que incluam o espermatozoide como fator, seja um ponto-chave.

2.4 METABOLISMO LIPÍDICO DE EMBRIÕES BOVINOS

A glicose e os ácidos graxos são as fontes mais comuns de energia para as células de mamíferos e seus substratos passam por oxidação nas mitocôndrias. Além disso, os lipídios são biomoléculas essenciais das células e fazem parte da membrana plasmática e das membranas de várias organelas, funcionando como moléculas sinalizadoras que atuam em eventos fundamentais para o desenvolvimento embrionário, implantação e crescimento pós-implantação (Paolo, 2006).

O triglicerídeo (TAG) é a principal classe lipídica de ácidos graxos e ficam armazenados como gotículas no citoplasma de células de mamíferos (Ferguson, 1999). Essas gotículas servem como fonte energética para oócitos e embriões no desenvolvimento inicial. Para que se atenda as demandas energéticas, os ácidos graxos, provenientes da quebra das gotas lipídicas, são metabolizados na mitocôndria por meio da β -oxidação (Dunning et al., 2010), além disso, os lipídios também estão

presentes na membrana plasmática através dos fosfolipídios, e sua missão é de determinar funções importantes como a fluidez da membrana, permeabilidade e comportamento de fase térmica (Edidin, 2003).

O perfil lipídico e a quantidade de gotículas lipídicas, sofrem alterações de acordo com as condições em que estão, deste modo embriões bovinos produzidos no sistema *in vitro* (PIVE) apresentam um maior acúmulo lipídico, quando comparados com os produzidos *in vivo* (Rizos et al., 2002), provavelmente devido ao soro fetal bovino presente nos meios de (Abe et al., 2002; Rizos, 2002; Barceló-Fimbres, 2007). Abe et al (2002) demonstraram que embriões cultivados com soro fetal bovino (SFB), possuem maior quantidade de lipídios e altos níveis de mitocôndrias imaturas. Del Collado (2017) demonstrou ainda, que mesmo produzindo embriões *in vitro* e cultivando-os em baixa tensão de oxigênio e sem soro fetal bovino, o acúmulo lipídico e estresse celular embrionário, ainda aconteceram.

Sudano et al., (2012) descreveram que a quantidade de lipídios permanece relativamente estável, durante as primeiras clivagens, mas há a tendência de aumentar as concentrações de TAGs, especialmente na MCI, ao longo do desenvolvimento do embrião. No entanto, os blastocistos expandidos no oitavo dia (D8) possuem maior conteúdo lipídico quando comparados com aqueles expandidos no D7, sugerindo que o prolongamento do período de cultivo pode levar a alterações no metabolismo lipídico. Esses resultados destacam que a origem do oócito (Folículos grande ou pequeno) e a velocidade de desenvolvimento pode influenciar na quantificação lipídica.

No entanto, o excesso de lipídio, intensifica o trabalho das mitocôndrias, o que não só aumenta a produção de energia, mas também eleva a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são geradas quando O_2 é reduzido por elétrons liberados formando o superóxido O_2^- , podendo ser derivado em vários EROs (Al-Gubory et al., 2010). EROs podem potencializar o estresse oxidativo (Abe et al., 2002), causar a peroxidação lipídica ligada ao bloqueio da divisão celular (Noda, et al. 1991), dano na função mitocondrial (Richter, et al. 1995, Roth 2018), modificações no DNA (Birben, et al. 2012), causando uma redução significativa no desenvolvimento de oócitos e embriões (Kala, et al., 2017) e na qualidade do mesmo. Desta forma, além de comprometer a dinâmica celular e o potencial de desenvolvimento embrionário, o acúmulo lipídico também influencia diretamente na capacidade de sobrevivência desses embriões durante a criopreservação.

Embriões que possuem maior quantidade de lipídios, podem ter seu processo de criopreservação prejudicado, além de aumentar os riscos de lesões celulares (Costa et al., 2020). Acredita-se que a sensibilidade a criopreservação tenha como motivo a mudança na fluidez e função da membrana plasmática, o que conseqüentemente provoca complicações relacionadas à permeabilidade celular aos

crioprotetores, além do fato de que a lipoperoxidação maior em embriões com maior conteúdo lipídico produz maior quantidade de radicais livres intensificando a morte embrionária por estresse oxidativo (Barceló-fimbres; Seidel., 2007).

Genes relacionados ao metabolismo lipídico, estresse oxidativo e apoptose se mostram mais expressos em embriões de touros nelore classificados como baixa fertilidade PIVE (De Almeida, 2022). Além disso Lockhart et al., (2023) ao utilizar touros de alto e baixo desempenho na PIVE, notaram que os de baixo desempenho apresentavam maior taxa de autofagia (Lockhart, 2023).

Portanto, o acúmulo lipídico influencia diretamente a qualidade, viabilidade e criotolerância dos embriões, especialmente em sistema de PIVE. Fatores como origem do oócito, condições de cultivo e o tempo de cultivo são elementos que afetam a quantidade e o perfil lipídico. No entanto, não se sabe ainda os efeitos que a fertilidade do touro causa no metabolismo lipídico e no seu acúmulo no embrião.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto do uso de sêmen proveniente de touros Nelore classificados quanto à fertilidade em programas de inseminação artificial em tempo fixo (IATF), sobre a produção de embriões *in vitro*, a cinética de desenvolvimento e o acúmulo lipídico embrionário.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a taxa de clivagem de blastocistos fecundados com sêmen de touros de alta e baixa fertilidade
- Avaliar a influência da fertilidade de touros a campo sobre a cinética de desenvolvimento embrionário *in vitro*.
- Avaliar a qualidade dos embriões de acordo com o número de células.
- Identificar a porcentagem de área ocupada por gotas lipídicas, de acordo com a cinética de desenvolvimento embrionário e a fertilidade do touro.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, Hiroyuki et al. Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, n. 1, p. 57-66, 2002.
- AL-GUBORY, Kaïs H.; FOWLER, Paul A.; GARREL, Catherine. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 42, n. 10, p. 1634-1650, 2010.
- ALVES, Máira Bianchi Rodrigues et al. Sperm-borne miR-216b modulates cell proliferation during early embryo development via K-RAS. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 10358, 2019.
- ANGUITA, Begoña et al. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, v. 67, n. 3, p. 526-536, 2007.
- ANNES, Kelly et al. Influence of follicle size on bovine oocyte lipid composition, follicular metabolic and stress markers, embryo development and blastocyst lipid content. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 31, n. 3, p. 462-472, 2019.
- ASBIA. Index ASBIA 2022. Associação Brasileira de Inseminação Artificial; Cepea – Esalq/USP. Elaboração: Cepea – Esalq/USP. Disponível em: https://asbia.org.br/wp-content/uploads/Index/Index_ASBIA_2022.pdf. Acesso em: 17 ago. 2023.
- ASSUMPCÃO, M. E. O. A. et al. Influence of heparin on bovine in vitro fertilization and embryo development. *Theriogenology*, v. 57, n. 5, p. 1391-1401, 2002.
- BÁEZ, F. et al. 32 Low oxygen tension during in vitro oocyte maturation and fertilisation improves cryotolerance of bovine blastocysts produced in vitro. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 34, n. 2, p. 251-251, 2021.
- BANG, Jae-Il et al. Proteomic identification of abnormally expressed proteins in early-stage placenta derived from cloned cat embryos. *Theriogenology*, v. 79, n. 2, p. 358-366.e1, 2013.
- BARCELO-FIMBRES, M.; SEIDEL JR, G. E. Effects of either glucose or fructose and metabolic regulators on bovine embryo development and lipid accumulation in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 74, n. 11, p. 1406-1418, 2007.
- BARCROFT, Lisa C. et al. Aquaporin proteins in murine trophectoderm mediate transepithelial water movements during cavitation. *Developmental Biology*, v. 256, n. 2, p. 342-354, 2003.
- BARUSELLI, Pietro S. Após 2 anos de queda, mercado de IATF retoma crescimento. *Boletim Eletrônico do Departamento de Reprodução Animal/FMVZ/USP*, 9ª ed., 26 fev. 2025. Disponível em: <https://asbia.org.br/usp-boletim-de-reproducao-animal-indica-retomada-da-iatf-em-2024/>. Acesso em:

08 de dez. de 2025.

BEEF IMPROVEMENT FEDERATION. *Category: Data Collection. BIF Guidelines Wiki*. Disponível em: https://guidelines.beefimprovement.org/index.php/Category:Data_Collection. Acesso em: 03 out. 2025.

BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organization Journal*, v. 5, p. 9-19, 2012.

BLOCKEY, M. A. deB. Serving capacity—a measure of the serving efficiency of bulls during pasture mating. *Theriogenology*, v. 6, n. 4, p. 393-401, 1976.

BOERKE, A.; DIELEMAN, S. J.; GADELLA, B. M. A possible role for sperm RNA in early embryo development. *Theriogenology*, v. 68, p. S147-S155, 2007.

BONI, Raffaele; CUOMO, Annunziata; TOSTI, Elisabetta. Developmental potential in bovine oocytes is related to cumulus-oocyte complex grade, calcium current activity, and calcium stores. *Biology of Reproduction*, v. 66, n. 3, p. 836-842, 2002.

BOUMERDASSI, Yasmine et al. Impact of oxygen tension during in vitro maturation: a sibling-oocyte prospective double-blinded study. *Fertility and Sterility*, v. 121, n. 4, p. 615-621, 2024.

BRACKETT, Benjamin G. et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biology of Reproduction*, v. 27, n. 1, p. 147-158, 1982.

BRADLEY, Josephine; SWANN, Karl. Mitochondria and lipid metabolism in mammalian oocytes and early embryos. *International Journal of Developmental Biology*, v. 63, n. 3-4-5, p. 93-103, 2019.

CARAYANNOPOULOS, Mary O. et al. GLUT8 is a glucose transporter responsible for insulin-stimulated glucose uptake in the blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 13, p. 7313-7318, 2000.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3. ed. Belo Horizonte: CBRA, 2013. 104 p.

CHAMAYOU, Sandrine et al. The use of morphokinetic parameters to select all embryos with full capacity to implant. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, v. 30, p. 703-710, 2013.

CHAZAUD, Claire et al. Early lineage segregation between epiblast and primitive endoderm in mouse blastocysts through the Grb2-MAPK pathway. *Developmental Cell*, v. 10, n. 5, p. 615-624, 2006.

CHEN, Lingyi et al. Molecular basis of the first cell fate determination in mouse embryogenesis. *Cell Research*, v. 20, n. 9, p. 982-993, 2010.

COLLADO-FERNANDEZ, E.; PICTON, H. M.; DUMOLLARD, R. Metabolism throughout follicle and oocyte development in mammals. *International Journal of Developmental Biology*, v. 56, n. 10-12,

p. 799-808, 2012.

COSTA, Camila Bortoliero et al. Influence of cAMP modulator supplementation of in vitro culture medium on *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology*, v. 141, p. 134-141, 2020.

CUNNINGHAM, Bradley G. Klein. *Cunningham: Tratado de fisiologia veterinária*. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

DE ALMEIDA, Tamie Guibu et al. Paternal effect does not affect in vitro embryo morphokinetics but modulates molecular profile. *Theriogenology*, v. 178, p. 30-39, 2022.

DEL COLLADO, M. B. Metabolismo lipídico e estresse celular durante a maturação oocitária e o desenvolvimento embrionário in vivo e in vitro em bovinos. 2017. 222 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

DEL COLLADO, Maite et al. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 28, n. 11, p. 1721-1732, 2016.

DI PAOLO, Gilbert; DE CAMILLI, Pietro. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, v. 443, n. 7112, p. 651-657, 2006.

DUKES; REECE, W. O. *Dukes: Fisiologia dos animais domésticos*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

DUNNING, Kylie R. et al. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biology of Reproduction*, v. 83, n. 6, p. 909-918, 2010.

FENWICK, J. et al. Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro. *Human Reproduction*, v. 17, n. 2, p. 407-412, 2002.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. Triglyceride content of bovine oocytes and early embryos. *Reproduction*, v. 116, n. 2, p. 373-378, 1999.

FERRÉ, L. et al. Sperm selection methods and their impact on assisted reproductive technology outcomes. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 55, supl. 2, p. 14-20, 2020.

FEUGANG, J. M. et al. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 21, n. 3, p. 312-324, 2010.

GALVÃO, Ana Luiza Carvalho de Oliveira. Fertilidade de touros e suas interações com fatores relacionados às fêmeas em programas de inseminação artificial em tempo fixo. 2021. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo.

GARDNER, D. K.; KELLEY, R. L. Impact of the IVF laboratory environment on human

preimplantation embryo phenotype. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, v. 8, n. 4, p. 418-435, 2017.

GOPICHANDRAN, N.; LEESE, H. J. Metabolic characterization of the bovine blastocyst, inner cell mass, trophoctoderm and blastocoel fluid. *Reproduction*, v. 126, n. 3, p. 299-308, 2003.

GORDON, Ian. *Laboratory production of cattle embryos*. Cabi, 2003.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Effect of speed of development on mRNA expression pattern in early bovine embryos cultured in vivo or in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 68, n. 4, p. 441-448, 2004.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. *Reproduction in Farm Animals*. 7. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2000. 509 p.

HAMATANI, Toshio et al. Dynamics of global gene expression changes during mouse preimplantation development. *Developmental Cell*, v. 6, n. 1, p. 117-131, 2004.

HAMILTON, W. J.; LAING, J. A. Development of the egg of the cow up to the stage of blastocyst formation. *Journal of Anatomy*, v. 80, pt. 4, p. 194, 1946.

HANSEN, Peter James. Pressing needs and recent advances to enhance production of embryos in vitro in cattle. *Animal Reproduction*, v. 21, n. 3, p. e20240036, 2024.

HARVEY, Alexandra J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. *Animal Reproduction Science*, v. 98, n. 1-2, p. 113-128, 2007.

HARVEY, Alexandra J.; KIND, Karen L.; THOMPSON, Jeremy G. REDOX regulation of early embryo development. *Reproduction*, v. 123, n. 4, p. 479-486, 2002.

HE, Kan et al. A comparative genome analysis of gene expression reveals different regulatory mechanisms between mouse and human embryo pre-implantation development. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 8, p. 1-15, 2010.

HOME, Pratik et al. GATA3 is selectively expressed in the trophoctoderm of peri-implantation embryo and directly regulates Cdx2 gene expression. *Journal of Biological Chemistry*, v. 284, n. 42, p. 28729-28737, 2009.

HYTTEL, P. et al. Transcription and cell cycle-dependent development of intranuclear bodies and granules in two-cell bovine embryos. *Reproduction*, v. 108, n. 2, p. 263-270, 1996.

JIANG, Zongliang et al. Transcriptional profiles of bovine in vivo pre-implantation development. *BMC Genomics*, v. 15, p. 1-15, 2014.

JUKAM, David; SHARIATI, S. Ali M.; SKOTHEIM, Jan M. Zygotic genome activation in vertebrates. *Developmental Cell*, v. 42, n. 4, p. 316-332, 2017.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Energy metabolism in preimplantation bovine embryos derived in vitro or in vivo. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 4, p. 847-856, 2000.

KIRKEGAARD, Kirstine et al. Time-lapse parameters as predictors of blastocyst development and pregnancy outcome in embryos from good prognosis patients: a prospective cohort study. *Human Reproduction*, v. 28, n. 10, p. 2643-2651, 2013.

KOYAMA, Keisuke et al. Aging-related changes in in vitro-matured bovine oocytes: oxidative stress, mitochondrial activity and ATP content after nuclear maturation. *Journal of Reproduction and Development*, v. 60, n. 2, p. 136-142, 2014.

KROPP, Jenna et al. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. *BMC Genomics*, v. 18, p. 1-15, 2017.

LIMA, I. M. T.; SOUZA, A. L. Desenvolvimento e sobrevivência de embriões no período de pré-implantação: enfoque em ruminantes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 33, n. 4, p. 194-202, 2009.

LISHKO, Polina V. et al. The control of male fertility by spermatozoan ion channels. *Annual Review of Physiology*, v. 74, n. 1, p. 453-475, 2012.

LIVEIRA, L. Z. et al. Incubation with sperm enhances in vitro maturation of the oocyte and subsequent embryo development in bovine species. *Theriogenology*, v. 81, n. 2, p. 284-289, 2014.

LONERGAN, Pat; FAIR, Trudee; FORDE, Niamh; RIZOS, Dimitrios. Embryo development in dairy cattle. *Theriogenology*, v. 86, n. 1, p. 270-277, 2016.

MACHADO, G. M. et al. Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*, v. 71, n. 8, p. 1289-1297, 2009.

MARKET VELKER, Brenna A.; DENOMME, Michelle M.; MANN, Mellissa R. W. Loss of genomic imprinting in mouse embryos with fast rates of preimplantation development in culture. *Biology of Reproduction*, v. 86, n. 5, p. 143, 1-16, 2012.

MCKEEGAN, Joseph P. Metabolic regulation during early embryo development. 2015. Tese (Doutorado) – Hull York Medical School, The University of Hull and the University of York, Heslington.

MILLER, D. J. et al. Heparin-induced capacitation of bovine spermatozoa: a role for intracellular calcium. *Biology of Reproduction*, v. 50, n. 3, p. 675-683, 1994.

MILLER, David. Ensuring continuity of the paternal genome: potential roles for spermatozoal RNA in mammalian embryogenesis. *Society of Reproduction and Fertility Supplement*, v. 65, p. 373-389, 2007.

MILLER, David; OSTERMEIER, G. Charles; KRAWETZ, Stephen A. The controversy, potential and roles of spermatozoal RNA. *Trends in Molecular Medicine*, v. 11, n. 4, p. 156-163, 2005.

NODA, Yoichi et al. Involvement of superoxide radicals in the mouse two-cell block. *Molecular Reproduction and Development*, v. 28, n. 4, p. 356-360, 1991.

NOGUEIRA, Ériklis et al. Qualidade do sêmen e resultados em programas de IATF em bovinos. In: REUNIÃO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANDROLOGIA ANIMAL – ABRAA, 4., 2019, Goiânia. Anais... Campo Grande, MS: UFMS, 2019. p. 28-37. e-ISBN 978-85-7613-589-0.

OLIVEIRA, Bruna Marcelle et al. Fertility and uterine hemodynamic in cows after artificial insemination with semen assessed by fluorescent probes. *Theriogenology*, v. 82, n. 5, p. 767-772, 2014.

OSTERMEIER, G. Charles et al. Delivering spermatozoan RNA to the oocyte. *Nature*, v. 429, n. 6988, p. 154-154, 2004.

PANTALEON, M. et al. Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 94, n. 8, p. 3795-3800, 1997.

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

PAYAN-CARREIRA, Rita et al. Molecular markers in sperm analysis. In: SUCCESS IN ARTIFICIAL INSEMINATION - Quality of Semen and Diagnostics Employed. Rijeka, Croatia: InTech, 2013. p. 93-115.

PERTOFT, Håkan. Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, v. 44, n. 1-2, p. 1-30, 2000.

PICTON, Helen; BRIGGS, David; GOSDEN, Roger. The molecular basis of oocyte growth and development. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 145, n. 1-2, p. 27-37, 1998.

PLANTE, Louise et al. Cleavage and 3H-uridine incorporation in bovine embryos of high in vitro developmental potential. *Molecular Reproduction and Development*, v. 39, n. 4, p. 375-383, 1994.

RICHARDS, JoAnne S. et al. Ovulation: new dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. *Annual Review of Physiology*, v. 64, n. 1, p. 69-92, 2002.

RICHTER, Christoph et al. Oxidants in mitochondria: from physiology to diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1271, n. 1, p. 67-74, 1995.

RIZOS, Dimitrios et al. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. *Molecular Reproduction and Development*, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

RODRIGUEZ, Shirley Andrea Florez. Impacto da qualidade espermática sobre a fertilidade in vivo

em bovinos: contribuição de marcadores mitocondriais e subpopulações espermáticas. 2017. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

ROTH, Zvi. Symposium review: reduction in oocyte developmental competence by stress is associated with alterations in mitochondrial function. *Journal of Dairy Science*, v. 101, n. 4, p. 3642-3654, 2018.

SÁ FILHO, Manoel et al. *Concept Plus 2022*. 7. ed. Uberaba, MG: Alta Genetics, 2022. 88 p. ISBN 978-65-5668-075-0. DOI: 10.26626/978-65-5668-075-0.2022B0001.

SAACKE, R. G. et al. Relationship of seminal traits and insemination time to fertilization rate and embryo quality. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 663-677, 2000.

SALUMETS, Andres et al. Early cleavage predicts the viability of human embryos in elective single embryo transfer procedures. *Human Reproduction*, v. 18, n. 4, p. 821-825, 2003.

SASSEVILLE, Maxime et al. Regulation of gap junctions in porcine cumulus-oocyte complexes: contributions of granulosa cell contact, gonadotropins, and lipid rafts. *Molecular Endocrinology*, v. 23, n. 5, p. 700-710, 2009.

STRINGFELLOW, David A.; GIVENS, M. Daniel. Manual of the International Embryo Transfer Society: a procedural guide and general information for the use of embryo transfer technology emphasizing sanitary procedures. Champaign: International Embryo Transfer Society, 2010.

SAVANNAH, A. R. et al. Evaluation of embryo development stages in bovine in vitro fertilization. *Journal of Animal Reproduction*, v. 20, n. 1, p. 45-52, 2023.

SCHULTZ, Richard M. From egg to embryo: a peripatetic journey. *Reproduction*, v. 130, n. 6, p. 825-828, 2005.

SCHULZ, K. N.; HARRISON, M. M. Mecanismos que regulam a ativação do genoma zigótico. *Nature Reviews Genetics*, v. 20, n. 4, p. 221-234, 2019.

SCIORIO, R.; SMITH, G. D. Embryo culture at a reduced oxygen concentration of 5%: a mini review. *Zygote*, v. 27, n. 6, p. 355-361, 2019.

SENEDA, Marcelo Marcondes et al. Oogênese e foliculogênese em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 45, p. 323-328, 2021.

STEPHENSON, Robert Odell; YAMANAKA, Yojiro; ROSSANT, Janet. Disorganized epithelial polarity and excess trophectoderm cell fate in preimplantation embryos lacking E-cadherin. *Development*, v. 137, n. 20, p. 3383-3391, 2010.

SUGIMURA, Satoshi; AKAI, Tomonori; IMAI, Kei. Selection of viable in vitro-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *Journal of Reproduction and*

Development, v. 63, n. 4, p. 353-357, 2017.

THOMPSON, J. G. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos—a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 263-275, 2000.

THOMPSON, Jeremy G. Defining the requirements for bovine embryo culture. *Theriogenology*, v. 45, n. 1, p. 27-40, 1996.

VAN SOOM, Ann et al. Compaction rate of in vitro fertilized bovine embryos related to the interval from insemination to first cleavage. *Theriogenology*, v. 38, n. 5, p. 905-919, 1992.

VANDAELE, Leen et al. Is apoptosis in bovine in vitro produced embryos related to early developmental kinetics and in vivo bull fertility? *Theriogenology*, v. 65, n. 9, p. 1691-1703, 2006.

VARAGO, R. C. et al. In vitro maturation of oocytes with special reference to goat. *Biotechnology*, v. 7, n. 4, p. 599-611, 2008.

VIANA, Joao Henrique Moreira. Development of the world farm animal embryo industry over the past 30 years. *Theriogenology*, 2024.

VIANA, João Henrique Moreira; FIGUEIREDO, Ana Cristina Silva; SIQUEIRA, Luiz Gustavo Bruno. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Animal Reproduction*, v. 14, n. 3, p. 476-481, 2018.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. *Journal of Animal Science*, v. 85, n. suppl_13, p. E1-E3, 2007.

WATSON, Andrew J.; BARCROFT, Lisa C. Regulation of blastocyst formation. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*, v. 6, p. 708-718, 2001.

WRIGHT, Shirley J. Sperm nuclear activation during fertilization. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 46, p. 133-178, 1999.

YU, Chao et al. BTG4 is a meiotic cell cycle–coupled maternal-zygotic-transition licensing factor in oocytes. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 23, n. 5, p. 387-394, 2016.

ZENG, Fanyi; SCHULTZ, Richard M. RNA transcript profiling during zygotic gene activation in the preimplantation mouse embryo. *Developmental Biology*, v. 283, n. 1, p. 40-57, 2005.

ZENKER, Jennifer et al. Expanding actin rings zipper the mouse embryo for blastocyst formation. *Cell*, v. 173, n. 3, p. 776-791.e17, 2018.

ZHANG, Ying et al. Sperm-borne tsRNAs and miRNAs analysis in relation to dairy cattle fertility. *Theriogenology*, v. 215, p. 241-248, 2024.

ZHU, Meng et al. Actomyosin polarisation through PLC-PKC triggers symmetry breaking of the mouse embryo. *Nature Communications*, v. 8, n. 1, p. 921, 2017.

Mendeley, Zotero.

CAPÍTULO 2 – EFEITO DA FERTILIDADE PATERNA NA CINÉTICA EMBRIONÁRIA E ACÚMULO LIPÍDICO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

RESUMO

Bull fertility is often associated with embryonic development, but this relationship is not yet fully understood. Bulls from semen centers were classified according to their pregnancy rates in FTAI (BIF accuracy > 24%): >55% as high fertility (HF) and <40% as low fertility (LF). Five bulls per group were evaluated in three replicates, forming routines composed of one HF, one LF, and one control. A total of 1,500 grade 1 and 2 oocytes were recovered from slaughterhouse ovaries. For maturation, fertilization, and in vitro culture, commercial medium (Cenatte®) and a controlled atmosphere (38.5°C; 6% CO₂; 6% O₂) were used. In total, 740 oocytes were fertilized with HF semen and 760 with LF semen. After Percoll selection, the semen samples showed similar motility and vigor (AF=73.6%±4.52; BF=69%±4.52; P=0.47). Cleavage did not differ between groups, but in the LF group there was a higher incidence of slow embryos (≤6 cells on D4) (P=0.0038). Blastocyst rates on D7 were similar (HF=27.6%; LF=25.5%; P=0.83), as was the developmental stage (P=0.31). Seventy-nine expanded blastocysts were evaluated on D7 (43 HF; 36 LF). The mean number of cells was similar (HF=136; LF=130; P=0.54), but the lipid content was higher in the LF group (31.61 vs. 13.31; P=0.0005). Although embryo quality, based on cell numbers, did not differ, the higher lipid accumulation in BF suggests metabolic changes that may compromise post-transfer or cryopreservation viability. The selection of fast embryos (≥8 cells on D4) may be especially relevant for BF bulls. Further studies are needed to elucidate these mechanisms.

Keywords: Bull fertility, Kinetics, IVF, Lipids

1. INTRODUÇÃO

A eficiência reprodutiva é um fator determinante para a sustentabilidade e competitividade do setor pecuário (Baruselli et al., 2012), e pode ser impactada por diversos fatores, dentre eles a fertilidade do touro. Nesse contexto, biotecnologias como a inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE), estão cada vez mais consolidadas como ferramentas estratégicas para intensificar o melhoramento genético e otimizar a reprodução dos rebanhos.

A fertilidade dos touros é um atributo multifatorial, como motilidade, vigor, integridade da membrana plasmática e competência funcional dos espermatozoides (Kropp et al., 2017). No entanto, mesmo touros com sêmen considerado de boa qualidade em exames andrológicos e laboratoriais podem apresentar baixa fertilidade a campo (Kastelic; Thundathil, 2008), o que evidencia a limitação desses métodos para prever, com precisão, o potencial reprodutivo real de cada animal. E considerando a complexidade de processos envolvidos na classificação da fertilidade de touros, as centrais de coleta e processamento de sêmen tem classificado os touros em alta e baixa fertilidade, de acordo com as prenhez geradas por IATF, estratégia que demanda tempo e geram alto custo.

Mesmo com os avanços na PIVE, os resultados obtidos em laboratório ainda não refletem de forma fidedigna, o desempenho reprodutivo dos touros a campo e ainda são escassos os estudos que explicam a relação da fertilidade do touro com o desempenho embrionário *in vitro*. Esses estudos, no entanto, têm norteado os caminhos para o entendimento dessa complexa relação. Entre eles podemos citar diferenças da cinética do desenvolvimento embrionário (Sudano et al., 2014; Alves, 2019) e dos perfis transcriptômicos (Kropp et al., 2017; Zang et al., 2024), demonstrando relação dos transcritos com o metabolismo e a função mitocondrial. A variação do conteúdo lipídico, associada a criotolerância também já foi relacionada a fatores paternos (Sudano et al., 2014).

Desta forma, o presente estudo teve como objetivo identificar como a fertilidade de touros Nelore, previamente classificados como de alta ou baixa fertilidade à IATF, afetam o desenvolvimento embrionário *in vitro*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Classificação dos touros

Utilizou-se sêmen de 10 touros da raça Nelore, sendo 5 touros de alta fertilidade e 5 touros de baixa fertilidade. A classificação considerou apenas touros cuja acurácia das estimativas calculadas, de acordo com os critérios da Beef Improvement Federation, fosse superior a 24%. A avaliação da

fertilidade foi realizada utilizando um modelo animal bayesiano que considerou efeitos fixos (como grupo contemporâneo e idade da fêmea) e efeitos aleatórios (como efeitos genéticos diretos). Os touros selecionados apresentavam histórico de aproximadamente 8.500 inseminações avaliadas, garantindo assim confiabilidade adequada das estimativas utilizadas na composição dos grupos experimentais. Touros com taxas de prenhez $\geq 55\%$ foram considerados de alta fertilidade, enquanto aqueles que tinham $\leq 40\%$ foram considerados de baixa fertilidade. As doses de sêmen foram adquiridas de empresas comerciais, e o sêmen de cada touro, proveniente da mesma partida, foi submetido a três rotinas de PIVE.

Foram realizadas 17 rotinas, nas quais os COCs eram homogeneamente distribuídos para FIV com três touros: Alta fertilidade, Baixa Fertilidade e Controle. O touro controle tinha o desempenho conhecido e somente rotinas em que ele atingia no mínimo 20% de taxa de blastocisto foram consideradas para esse estudo, caso contrário, a rotina era descartada. 2 rotinas foram descartadas pelo motivo descrito, sendo apenas 15 rotinas consideradas para este estudo.

Produção In Vitro de Embriões

Os complexos oócito-cumulus (COCs) foram recuperados de ovários obtidos de abatedouro, localizado a 20 km de distância do laboratório de biotecnologias da reprodução da UEMS. Os ovários foram transportados em garrafa térmica contendo solução de NaCl 0,9%, a temperatura de 34 a 37°C. Foram puncionados folículos de 3-8mm de diâmetro e os COCs recuperados e classificados de acordo com o aspecto e distribuição das células do cumulus e uniformidade do citoplasma (Stojkovic et al., 2001).

Somente os COCs classificados como grau 1 e 2 foram utilizados no processo de MIV (Figura 4). Todos os meios utilizados foram adquiridos da Cenatte® Embriões. Para a lavagem do oócitos e MIV, utilizou-se meio a base de TCM hepes (*Tissue Culture Medium 199*), soro fetal bovino, solução antibiótica e alíquotas hormonais. Para a FIV, o meio utilizado para a lavagem dos oócitos maturados foi o H199 com BSA e antibiótico, enquanto a lavagem do sêmen e gotas de FIV, foram o TL (Tyrode's Lactate Solution) com BSA, antibiótico e alíquotas hormonais. O meio de cultivo era a base de Synthetic Oviduct Fluid (SOF), soro fetal bovino, solução antibiótica e alíquotas hormonais.

Os COCs permaneceram na MIV por 22 - 24 horas. Após a MIV, o sêmen foi submetido a metodologia de Percoll (Henkel e Schill, 2003). Após o Percoll, a amostra de sêmen foi diluída em 200 μ l de FIV Touro, e desta amostra retirava-se 20 μ l para análises de motilidade e vigor e 10 μ l para análise de concentração na câmara de Neubauer. Em seguida, calculava-se a dose inseminante da seguinte forma:

$[(\text{Volume da gota} \times \text{concentração final}) / (\text{média câmarade Neubauer} \times \text{fator de diluição})] + \text{ajuste de motilidade} =$

A fim de garantir 1×10^6 em gotas de 40 μl .

Após a inseminação dos COCs maduros as placas permaneciam incubadas por um período de 18 – 22 horas em, meio próprio para a fertilização. Após esse período os prováveis zigotos eram transferidos para gotas de meio CIV, onde permaneceram por até nove dias. Todas as etapas foram realizadas em incubadora EVE (WTA®) a 38,5°C, e atmosfera de 6% de CO₂, 6% de O₂, 88% N₂ em ar.

Classificação da cinética de desenvolvimento embrionário

No quarto dia (D4) após a FIV, avaliou-se os embriões clivados em grupos de rápidos e lentos, sendo considerados lentos os embriões que apresentavam 4 ou 6 células e rápidos aqueles que apresentavam 8 ou mais células. Embriões de 2 células foram desconsiderados para essa classificação (lentos e rápidos), mas considerados para o cálculo de clivagem geral.

Calculou-se a taxa de clivagem da seguinte forma: n° de clivados/ n° total de COCs *100). No mesmo momento realizava-se o feeding, procedimento em que se retirava 50% do volume da gota e acrescentava-se 50% de meio fresco estabilizado nas condições do cultivo. No sétimo dia após a FIV (D7), calculava-se a taxa de blastocisto da seguinte forma: $(n^\circ$ de blastocistos/ n° de COCs*100). Os embriões também foram classificados em grupos de rápidos e lentos, sendo lentos os blastocistos iniciais e blastocistos, enquanto os rápidos foram os blastocistos expandidos, blastocistos em eclosão ou eclodidos em D7.

Análises de fluorescência – Contagem de células e Quantificação lipídica

No dia 7 os blastocistos expandidos eram coletados, lavados em 3 gotas de 100 μl de PBS – Ca e Mg e armazenados em paraformaldeído a 3% e armazenados em microtubos de 1,5 ml contendo 500 μl da mesma solução. Em cada tubo eram armazenados até 5 embriões em geladeira à temperatura de 0° a 4° C por até 6 meses. Esses embriões foram destinados para as análises de contagem de células e quantificação lipídica.

As análises foram realizadas no laboratório multiusuário de avaliação de moléculas, células e tecidos (LabCel) na Universidade Federal de Goiás.

No momento do preparo para a análise, os embriões foram lavados duas vezes em solução de PBS (phosphate-buffered saline) sem cálcio e magnésio (D837- Sigma-Aldrich, USA), suplementada com 0,3% de PVP (Polivinilpirrolidona) (PVP40 - Sigma-Aldrich, USA). Para a quantificação do

conteúdo lipídico, foi utilizado o corante lipofílico Bodipy 493/503 (Thermo Fisher Scientific, USA).

A alíquota de Bodipy foi diluída em 50 µl de etanol absoluto, sendo posteriormente completada com 950 µl de solução PBS + PVP. Em seguida, os embriões foram incubados por 30 minutos em solução de Triton a 0,2%, com o objetivo de promover a permeabilidade das membranas celulares. Em seguida, os embriões foram novamente lavados por duas vezes na solução 0,3% PBS/PVP para a remoção do excesso de detergente e incubados na solução de Bodipy por 1 hora, em temperatura ambiente e protegidos de luz. Ao fim da incubação os embriões foram lavados em solução 0,3% PBS/PVP por 3 vezes, para retirar todo o background e colocados em lamínulas em gotas de 5 a 8 µl do mesmo meio de lavagem, e levados para a análise em microscópio confocal (Leica TCS SP8®). A excitação e emissão da fluorescência do Bodipy foram realizadas com Laser Argon 488 nm e filtros com emissão/excitação 493/503 nm, respectivamente.

Setenta e nove (79) imagens, sendo 46 BF e 36 AF, foram analisadas através do Software Image J. Para o Bodipy utilizou-se a ferramenta Freehand Selections para delimitar a fluorescência do embrião e de uma área aleatória do background da imagem. Ao obter-se as informações de área fluorescente do espécime, média de pixels e densidade integrada, calculou-se a intensidade de fluorescência e quantidade de lipídios. Para isso utilizamos a seguinte fórmula: Densidade integrada – (área*média de pixels), resultando assim na fluorescência total de células corrigida (CTC). O valor obtido através dessa equação foi dividido pelo valor de área (CTC/área).

Após a obtenção das imagens referentes ao Bodipy, os embriões foram removidos das lamínulas, lavados duas vezes em PBS + PVP e posteriormente incubados por 15 minutos em solução contendo 0,2 µl de Hoechst 33342 (10 mg/ml) diluído em 1000 µl de 0,3% PBS/PVP. Após o período de incubação, os embriões foram transferidos para lâminas e cobertos com cuidado por lamínulas e levados para o microscópio de fluorescência (Leica DM4B/câmera DFC700 T), para a obtenção das imagens. A ferramenta Multi-point do Image J foi utilizada para enumerar cada núcleo do embrião, sem correr o risco de repetir a contagem do mesmo blastômero.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o procedimento GLIMMIX do software SAS (SAS OnDemand for Academics). Os COCs foram considerados como unidade experimental. Para as variáveis relacionadas aos COCs, o modelo incluiu como efeito fixo o Grupo (alta ou baixa fertilidade na IATF), enquanto Touro e Rotina foram incluídos como efeitos aleatórios, a fim de controlar a variabilidade decorrente dos diferentes reprodutores e das distintas rotinas de produção in vitro. O oócito foi considerado

a unidade experimental. Para a análise da produção de embriões, os efeitos fixos considerados foram Grupo (alta ou baixa fertilidade na IATF). As diferenças entre os níveis dos efeitos fixos foram avaliadas por meio das médias ajustadas (LSMeans), comparadas pelo teste t, adotando-se nível de significância de 5% ($P < 0,05$).

3. RESULTADOS

Todas as doses de sêmen utilizadas foram submetidas a avaliação de motilidade e vigor após a realização do Percoll. A média da motilidade dos touros de AF foi de $73,6\% \pm 4,52$ e BF foi de $69\% \pm 4,52$ ($P=0,4715$), enquanto o vigor de ambos teve média $3 \pm 0,19$ ($P=0,32$).

Não foi observada variação na taxa de clivagem entre o grupo AF ($52,2\%$ - 386/740) e no BF ($46,6\%$ - 354/760; $p=0,3103$) (Figura 2).

Entre os embriões clivados do grupo AF, $58,5\%$ (137/234) se encontravam com 4 ou 6 células, sendo esse um desenvolvimento lento para a o momento da avaliação, enquanto $41,5\%$ (97/234) estavam com 8 ou mais células no mesmo momento, caracterizando desenvolvimento rápido. No grupo BF, a maioria dos embriões, $73,6\%$ (162/220), apresentou desenvolvimento lento e apenas $26,4\%$ (58/220) foram classificadas como de desenvolvimento rápido (Figura 3). Ao comparar a cinética de desenvolvimento entre os grupos AF e BF não houve diferença estatística ($P= 0,6613$), no entanto, dentro do grupo BF observou-se diferença entre lentos e rápidos ($P= 0,0038$).



Figura 2 - Taxa de clivagem de desenvolvimento de embriões PIVE oriundos de touros de alta e baixa

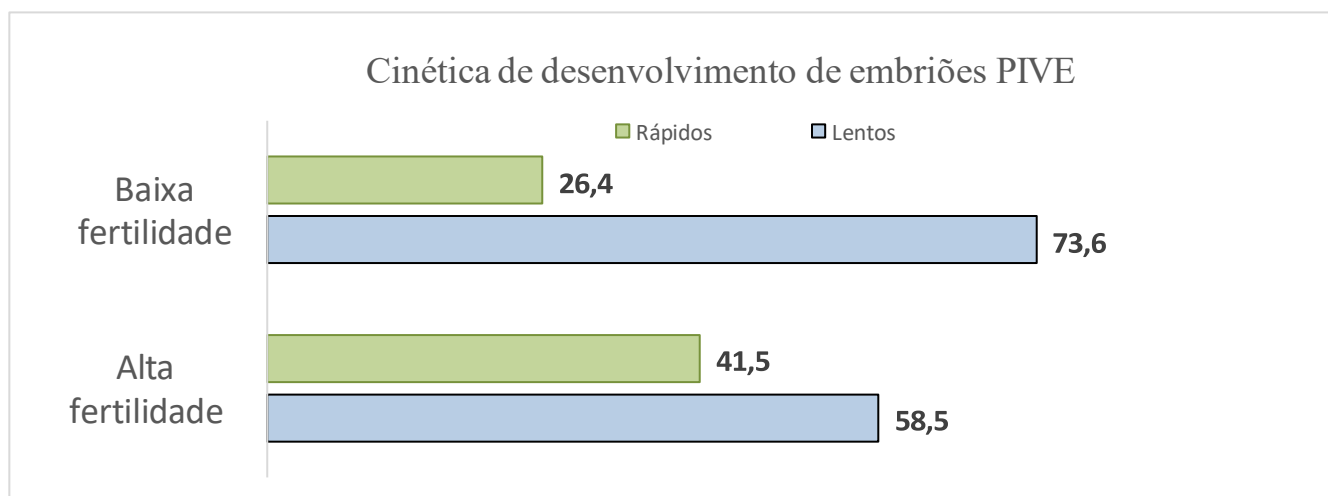


Figura 3 - Cinética de desenvolvimento de embriões PIVE em D4, oriundos de touros Nelore de alta e baixa fertilidade à IATF

A taxa de blastocistos para os touros AF foi de 27,6% (204/740), e a de BF foi de 25,5% (194/760) (Figura 4), não demonstrando diferença entre os grupos ($p=0,6419$). Em relação a cinética do desenvolvimento dos blastocistos presentes em D7 observou-se que no grupo AF 58,8% (120/204) eram blastocistos iniciais e blastocistos (BI/BL) e 41,2% (84/204) eram blastocistos expandidos e blastocistos em eclosão/eclodido (BX/BE). Já no grupo BF verificou-se que 55,2% (107/194) eram de BI/BL e 42% (87/194) BX/BE (Figura 5). Não demonstrando diferença entre os grupos ($P=0,8932$) mas não entre as proporções de estágios de desenvolvimento.

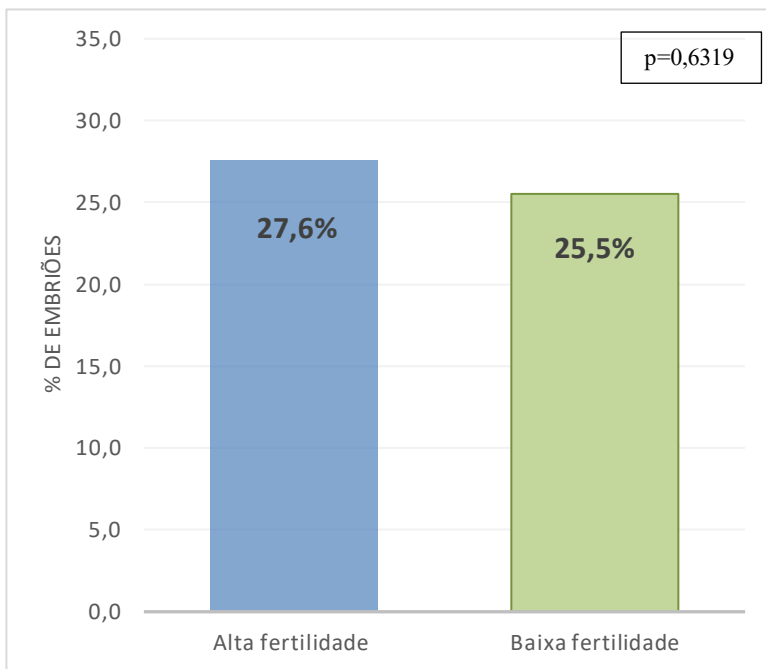


Figura 4 - Taxa de blastocistos de desenvolvimento de embriões PIVE oriundos de touros de alta e baixa fertilidade à IATF

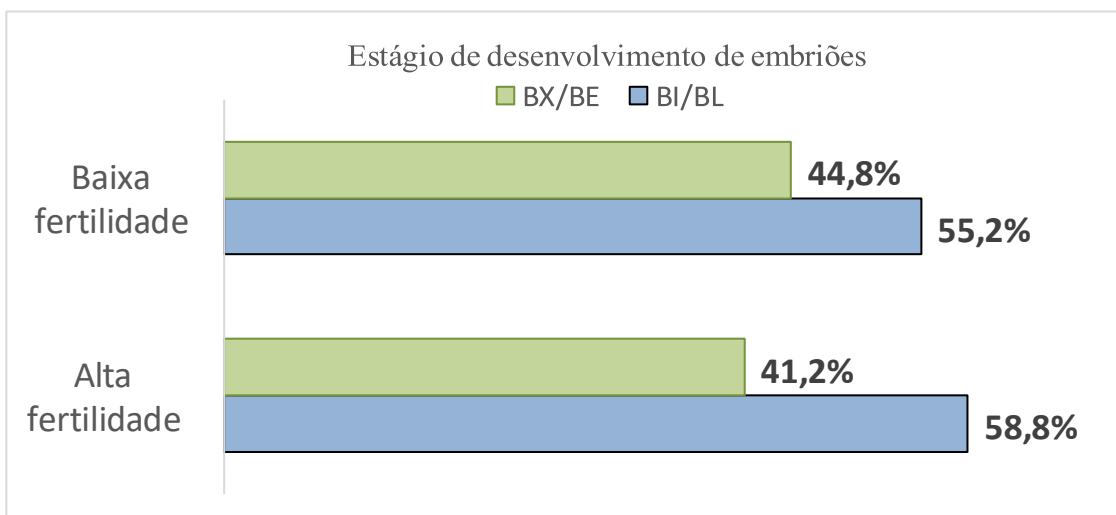


Figura 5 - Estágio de desenvolvimento de embriões PIVE oriundos de touros de alta e baixa fertilidade à IATF

A coloração azul (Hoechst 33342) indica o total de células nucleadas. Os embriões foram expostos à microscopia de fluorescência, e o número de células foi contado. O grupo de alta fertilidade apresentou em média $136 \pm 31,2$ células ($n = 36$), enquanto o grupo de baixa fertilidade apresentou $130 \pm 39,5$ células ($n = 46$), não havendo diferença entre os grupos ($P = 0,54$) (Figura 6).

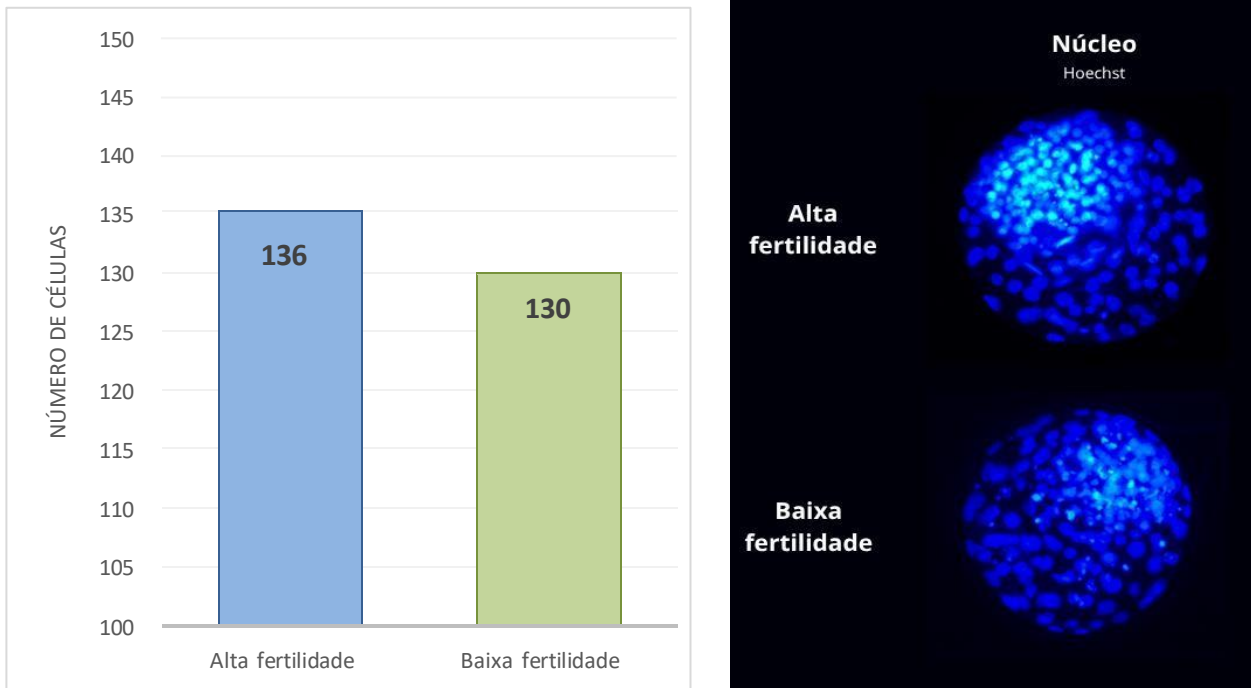


Figura 6 - Avaliação do número de células de blastocistos expandidos no D7

. A coloração verde (Bodipy) representa o conteúdo lipídico intracelular. Os embriões do grupo de alta fertilidade (n = 36) apresentaram uma média mais baixa ($p = 0,0005$) em média $13,31 \pm 14,85$ unidades arbitrárias, enquanto os embriões do grupo de baixa fertilidade apresentaram $31,61 \pm 27,14$ unidades arbitrárias (n=46) (Figura 7).

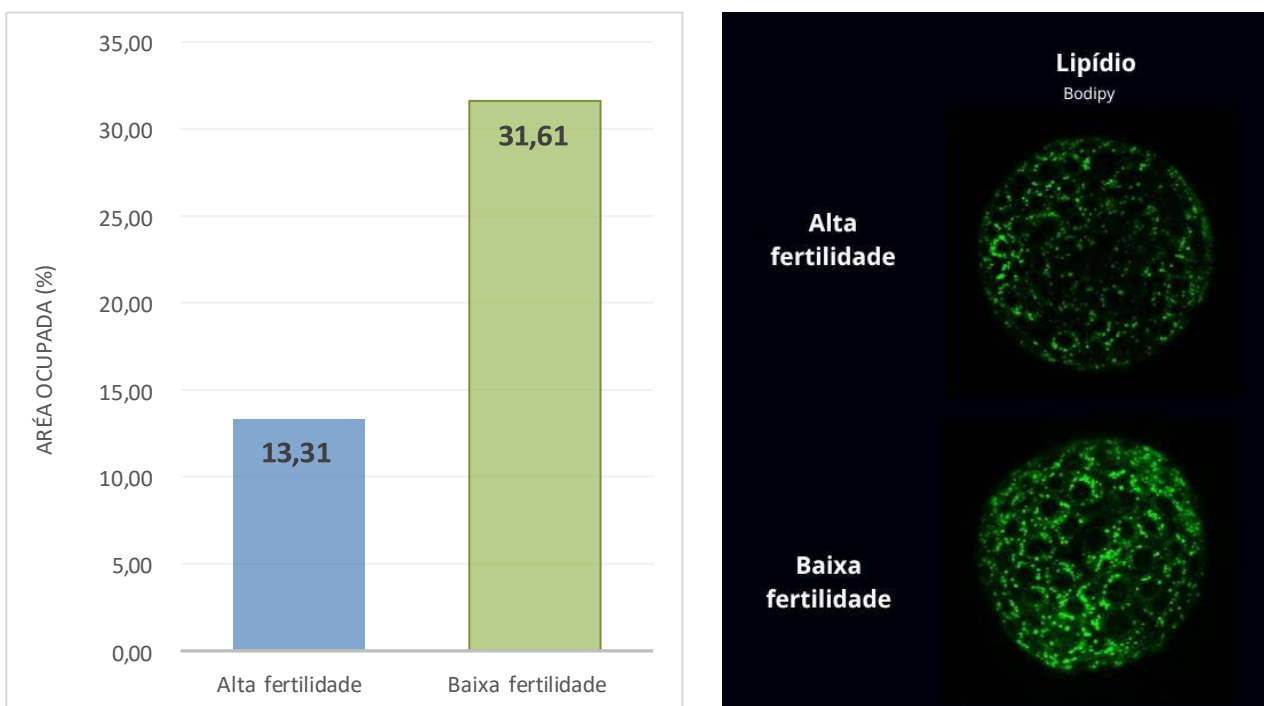


Figura 7: Quantificação lipídica de embriões PIVE oriundos de touro de alta e baixa fertilidade em IATF

4. DISCUSSÃO

Atualmente um dos indicadores de fertilidade mais acurados e utilizados pelas centrais de touros é a taxa de concepção, após a inseminação de muitas fêmeas., mas com o aumento da procura por touros jovens, é necessário buscar por outros tipos de análises capazes de predizer a fertilidade. Já foi demonstrado que há uma baixa correlação entre as avaliações laboratoriais de sêmen com os índices de fertilidade a campo (Oliveira et al., 2012; Nogueira et al., 2019). Em avaliações anteriores a preparação do sêmen *in vitro*, Zandonaide (2024), por exemplo, verificou que touros classificados como de alta fertilidade a campo pelo programa CONCEPT PLUS®, apresentaram maior motilidade e vigor médios (51,18% e 4,53) quando comparados com os de baixa fertilidade pelo mesmo programa (46% e 4,13). Portanto, ainda não está claro quais os parâmetros justificam a variação de fertilidade entre indivíduos.

No presente estudo os parâmetros seminais foram avaliados após a preparação do sêmen para a FIV no sistema de Percoll e não foi observada diferença significativa entre os touros de alta e baixa fertilidade à campo. Já foi demonstrado que o Percoll aumenta significativamente a porcentagem de espermatozoides de morfologia normal e diminuiu os espermatozoides anormais (Yue et al., 1995), assim como apresenta um aumento significativo na motilidade espermática (Carvalho et al., 2009), demonstrando que a seleção dos espermatozóides de melhor qualidade, por esta metodologia, minimiza o efeito do touro na FIV. Segundo Tanghe et al., (2002), a seleção espermática em gradiente de Percoll é mais eficiente na recuperação de espermatozoides moveis, especialmente de touros de baixa fertilidade na PIVE, quando comparados aos touros de alta fertilidade.

Outra hipótese a respeito das variações de resultados observados entre IATF e FIV refere-se ao ambiente, considerando que na produção *in vivo*, o espermatozoide enfrenta diversos desafios até a fecundação (Garrett et al., 2008), não enfrentados na FIV, na qual os espermatozoides passam por uma breve capacitação e em seguida são depositados diretamente sobre os oócitos maduros.

As principais diferenças entre touros, identificadas na FIV, estão associadas a variações na taxa de fecundação e penetração, na cinética das clivagens, nas taxas de blastocisto e na criotolerância dos embriões (Ward et al., 2002, 2003; Wilson et al., 2005; Xu et al., 2006). Corroborando com os resultados obtidos neste trabalho, outros estudos já demonstram não ter identificado diferenças entre touros na taxa de clivagem (Kropp et al., 2017; Ortega 2018; Almeida, 2022). A literatura indica que a suplementação de fontes de energia, como piruvato de sódio e o ajuste da concentração de heparina, pode melhorar a capacitação espermática favorecendo o desenvolvimento embrionário (Assumpção et al., 2002), no entanto, tais intervenções parecem não ser suficientes para compensar completamente os efeitos intrínsecos associados ao macho.

Diferente do presente estudo Alves (2019) ao utilizar touros da raça Aberdeen Angus observou diferença ao avaliar o desenvolvimento embrionário com 28-30 horas após a FIV, onde 27,47% embriões oriundos de touros de alta fertilidade já estavam clivando, enquanto apenas 18,70% dos embriões de grupo de baixa fertilidade estavam clivados no mesmo momento. Resultados semelhantes foram observados por Al Naib,(2011), que ao utilizar touros de alta e baixa fertilidade verificaram que os touros de alta fertilidade apresentaram taxa de clivagem superior aos touros de baixa fertilidade.

No presente estudo observou-se que a maior parte dos embriões oriundos de touros de baixa fertilidade apresentam clivagem inicial lenta. De acordo com a literatura os embriões que se desenvolvem lentamente tendem a apresentar metabolismo mais ativo, o que pode demonstrar a tentativa de compensar deficiências no desenvolvimento inicial, além de também estar associado a maior estresse celular (Milazzotto et al., 2016). Segundo Ward et al., (2001) touros de alta fertilidade possuem embriões de cinética inicial rápida. Mas há uma preocupação com o excesso de velocidade, pois já foi relatado que aqueles que se desenvolvem mais rapidamente, não são necessariamente os melhores embriões, visto que podem apresentar maior taxa de bloqueio embrionário, maior número de anomalias cromossômicas (Pers-Kamcztc et al., 2012), padrões de expressões genicas irregulares (Lonergan et al., 2000) e a perda de *imprinting* genômico (Market Velker et al., 2012).

A influência do touro na cinética de desenvolvimento está relacionada com a fase de replicação do DNA (fase S). Segundo Eid e seus colaboradores (1994), ao avaliar o tempo de início da clivagem e a duração da Fase S em zigotos oriundos de touros de alta e baixa fertilidade a campo, observou-se que zigotos de touros de alta fertilidade iniciam a fase de replicação de DNA mais cedo, no entanto a formação do pró-núcleo ocorre no mesmo intervalo de tempo em ambos os grupos. Esse atraso na ativação da replicação do DNA do zigoto pode ser devido à danos no DNA espermático, o que pode ser correlacionado a menor qualidade embrionária e redução na taxa de formação de blastocisto (Fatehi et al., 2013; Simões et al., 2013). Desta forma, acredita-se que o desenvolvimento inicial mais lento observado no grupo BF pode estar relacionado a um possível dano no DNA espermático.

No presente estudo, a taxa de blastocisto não foi influenciada pela fertilidade do touro a campo, assim como o seu estágio (BI/BL ou BX/BE) em D7. Da costa (2023) observou que os embriões expandidos com o maior número de células foram aqueles que apresentavam 4 ou mais células 41 horas após a fertilização. Adicionalmente, Oliveira et al., (2019), ao analisar embriões produzidos individualmente e avaliados em 48 e 120 horas pós-inseminação (hpi), observaram que embriões que possuem apenas 2 células em 48 hpi tiveram a menor probabilidade de atingir o estágio de blastocisto, enquanto aqueles que tinham 8 células no mesmo momento, tiveram maiores chances de se tornarem

blastocisto, mas apresentaram diminuição no número de células e aumento na taxa de apoptose. O estudo também demonstrou que os blastocistos com o maior número de células são oriundos de mórulas às 120 hpi. Desta forma, sugere-se que a velocidade de desenvolvimento inicial intermediária, seria a ideal, caracterizada pelos autores como 4 células às 48 hpi e mórula às 120 hpi, gerando blastocistos de melhor qualidade. No presente estudo, a avaliação foi realizada no D4 (aproximadamente 96 hpi), quando o ideal seria que os embriões estivessem com 16 células, no entanto, no grupo de baixa fertilidade, a maior parte estava com 4 ou 6 células. Verificou-se, no entanto, que esse grupo, apesar de gerar taxa de blastocisto semelhante, demonstrou metabolismo diferente, demonstrando que apenas a avaliação visual, comumente realizada, pode não ser suficiente para identificar os embriões com melhor chance de prenhez.

Uma fragilidade do presente estudo foi não ter considerado a qualidade visual do embrião na comparação entre grupos. De Almeida (2018) observou maior taxa de blastocistos grau I e II para touros Nelores de alta do que para touros de baixa fertilidade, (28,4% x 16%). Ortega et al. (2018) observaram que 2 dos 3 touros de baixa fertilidade avaliados produziram menos blastocistos *in vitro*, e produziram mais embriões com alterações morfológicas *in vivo*. Isso reforça a necessidade de não ser deixado de considerar a variabilidade individual nas interpretações baseadas em médias de grupos de touros. Zoca et al., (2023), observaram que touros de baixa SCR, tiveram maiores taxas de blastocisto, ao comparar com touros de alta SCR. Tais contradições demonstram que há fatores intrínsecos ainda desconhecidos que determinam a fertilidade *in vitro* e sua relação com a fertilidade *in vivo*

É fato que na reprodução *in vivo*, os espermatozoides precisam enfrentar diversos desafios no trato reprodutivo feminino (Suárez, 2016), além disso, a inseminação pode acontecer em diferentes momentos, exigindo que os gametas possuam capacidade de sobreviver por períodos prolongados ou de se capacitarem rapidamente (Saacke et al., 2000). Por outro lado, no ambiente *in vitro*, precisam ser mais resistentes a procedimentos e manipulação laboratorial para PIVE (Baldí et al., 2020). Essa diferença na exigência imposta aos espermatozoides, pode impactar não apenas na produção de blastocistos, mas também na qualidade dos embriões, que pode ser avaliada por sua morfologia e pelo número de células (Gordon, 1994). O número de células é um parâmetro relevante, visto que tem sido associado ao sucesso gestacional, como descrito por Kong e seus colaboradores (2016) em um estudo com embriões humanos produzidos por injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI).

No presente estudo, o número de células dos embriões expandidos no D7 foi similar entre embriões oriundos do touro de alta fertilidade (136) e de baixa fertilidade (130). Alves et al. (2019) ao utilizar sêmen criopreservado de touros da raça Aberdeen Angus, não encontraram diferença nas taxas

de blastocisto, assim como o presente estudo, no entanto observaram que touros de baixa fertilidade apresentavam embriões com um menor número de células (AF=182,37 e BF=119,30). Por outro lado, corroborando os resultados do presente estudo, Almeida (2019) encontrou médias de 123,2 e 113,1, para embriões oriundos de touro de raça Nelore de alta e baixa fertilidade, respectivamente. Esses achados sugerem que a qualidade do embrião, pode estar relacionada a fatores moleculares, entre eles os herdados do espermatozoide. O microRNA, miR-216b entregue pelo espermatozoide no momento da fecundação, cujos níveis variam conforme a fertilidade do touro, visto que a diferença de fertilidade afeta a expressão do gene-alvo KRAS responsável pela melhor eficiência no estágio de desenvolvimento inicial, melhor sincronia nas primeiras divisões celulares e aumento no número de células no blastocisto (Alves et al., 2019).

Como já citado anteriormente, embriões que clivam mais rápido tem uma maior probabilidade de se tornarem blastocisto. Sudano et al., (2014) relataram que o excesso de lipídio em embriões PIVE está associado a baixa qualidade embrionária e baixa sobrevivência após a criopreservação. Nesse contexto, Almeida (2018) identificou que embriões oriundos de touro de baixa fertilidade, apresentavam maior expressão de genes relacionados com o metabolismo lipídico. No presente estudo, embriões oriundos de touros de baixa fertilidade apresentaram maior acúmulo lipídico quando comparados com os embriões de alta fertilidade, reforçando a hipótese de que a contribuição paterna além de influenciar na cinética de desenvolvimento dos embriões, influência também no perfil metabólico, impactando diretamente na qualidade e no potencial de sobrevivência após a criopreservação.

Diante dos resultados observados, fica evidente que a determinação da fertilidade do touro ao se tratar da PIVE, não deve se limitar apenas aos parâmetros espermáticos convencionais, como motilidade e vigor. Embora o uso do Percoll possa uniformizar algumas características seminais, aspectos como a cinética de clivagem e conteúdo lipídico, podem ser influenciadas pelo touro nesse sentido, análises complementares como a avaliação da fragmentação do DNA espermático, mostram-se relevantes, uma vez que Fatehi et al., (2013) demonstraram que touros com fragmentação inferior a 10% apresentam maiores chances de gerar embriões viáveis. No entanto, considerando que esse tipo de avaliação nem sempre é realizado na rotina laboratorial, os achados desse estudo sugerem que, em touros de baixa fertilidade a seleção de embriões rápidos (acima de 6 células) em D4 pode permitir a seleção de blastocistos com menor conteúdo lipídico e, portanto, melhor sobrevivência a criopreservação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL NAIB, A. et al. In vitro assessment of sperm from bulls of high and low field fertility. *Theriogenology*, v. 76, n. 1, p. 161-167, 2011.

ALVES, Máira Bianchi Rodrigues et al. Sperm-borne miR-216b modulates cell proliferation during early embryo development via K-RAS. *Scientific Reports*, v. 9, n. 1, p. 10358, 2019.

ASSUMPÇÃO, Mayra Elena Ortiz D.'Avila et al. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 39, p. 149-156, 2002.

BAUMANN, Christoph G. et al. The quiet embryo hypothesis: molecular characteristics favoring viability. *Molecular reproduction and development*, v. 74, n. 10, p. 1345-1353, 2007.

BOZZI, Alexandre da Rocha. O impacto das alterações lipídicas e sua relação com a criopreservação, capacitação e fertilidade espermática de touros Nelore. 2025. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

CARVALHO, José de Oliveira et al. Cinética de espermatozoides criopreservados de bovinos após sexagem por citometria de fluxo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 44, p. 1346-1351, 2009.

COMIZZOLI, P. et al. Onset of the first S-phase is determined by a paternal effect during the G1-phase in bovine zygotes. *Biology of Reproduction*, v. 62, n. 6, p. 1677-1684, 2000.

COMIZZOLI, Pierre; MERMILLOD, Pascal; MAUGET, Robert. Reproductive biotechnologies for endangered mammalian species. *Reproduction Nutrition Development*, v. 40, n. 5, p. 493-504, 2000.

DA COSTA, W. C, C. et al. Blastocistos expandidos em D7 apresentam maior quantidade de células em relação ao D8 na produção de embriões bovinos in vitro. *Anais do ENIC*, 2023.

DE ALMEIDA, Tamie Guibu. Cinética e desenvolvimento embrionário in vitro de embriões bovinos de touros de alta e baixa fertilidade. 2018.

EID, L. N.; LORTON, S. P.; PARRISH, J. J. Paternal influence on S-phase in the first cell cycle of the bovine embryo. *Biology of reproduction*, v. 51, n. 6, p. 1232-1237, 1994.

FATEHI, A. N. et al. DNA damage in bovine sperm does not block fertilization and early embryonic development but induces apoptosis after the first cleavages. *Journal of andrology*, v. 27, n. 2, p. 176-188, 2006.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryo. Cambridge: CAB International, University Press, 1994. 640 p.

HALL, J. B. et al. Impact of delayed insemination on pregnancy rates to gender selected semen in a fixed-time AI system. *Theriogenology*, v. 102, p. 154-161, 2017.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 43, p. 368-373, 2008.

KONG, Xiangyi et al. The relationship between cell number, division behavior and developmental

potential of cleavage stage human embryos: a time-lapse study. *PLoS One*, v. 11, n. 4, p. e0153697, 2016.

KROPP, Jenna et al. Male fertility status is associated with DNA methylation signatures in sperm and transcriptomic profiles of bovine preimplantation embryos. *BMC genomics*, v. 18, n. 1, p. 280, 2017.

LONERGAN, Patrick et al. Factors influencing oocyte and embryo quality in cattle. *Reproduction Nutrition Development*, v. 41, n. 5, p. 427-437, 2001.

LONERGAN, Patrick et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 57, n. 2, p. 146-152, 2000.

MARKET VELKER, Brenna A.; DENOMME, Michelle M.; MANN, Mellissa RW. Loss of genomic imprinting in mouse embryos with fast rates of preimplantation development in culture. *Biology of Reproduction*, v. 86, n. 5, p. 143, 1-16, 2012.

MILAZZOTTO, Marcella Pecora et al. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. *Molecular reproduction and development*, v. 83, n. 4, p. 324-336, 2016.

NOGUEIRA, E.; SILVA, C.S.; SILVA, J.C.B.; GARCIA, W.R.; NACHE, N.A.; SILVA, K.C.; POTIENS, J.R.; COSTA E SILVA, E.V. Qualidade do sêmen e resultados em programas de IATF em bovinos. IV Reunião Anual da Associação Brasileira de Andrologia Animal, 2019, Goiânia, GO. Anais..., p. 28-37.

OLIVEIRA, C.J.T.; Gaveta, B.; Poehland, R.; Melo-Sterza, F.A. Conteúdo lipídico e atividade mitocondrial de embriões bovinos com diferentes cinéticas de desenvolvimento. XXXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Reprodução Animal. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. Anim. Reprod. 2020, 17.

OLIVEIRA, Letícia Zoccolaro et al. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. *Livestock Science*, v. 146, n. 1, p. 38-46, 2012.

ORTEGA, M. Sofia et al. Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. *Biology of reproduction*, v. 99, n. 6, p. 1244-1254, 2018.

PERS-KAMCZYC, E. et al. Early cleaved bovine embryos show reduced incidence of chromosomal aberrations and higher developmental potential on day 4.5 post-insemination. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. 6, p. 899-906, 2012.

SIMOES, Renata et al. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. *Reproduction*, v. 146, n. 5, p. 433-441, 2013.

SUDANO, Mateus J. et al. Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* in vitro-and in vivo-produced blastocysts. *Reproduction, Fertility and Development*, v. 26, n. 8, p. 1129-1141, 2014.

TANGHE, Sofie et al. Assessment of different sperm quality parameters to predict in vitro fertility of bulls. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 37, n. 3, p. 127-132, 2002.

THOMAS, J. M. et al. Evaluation of SexedULTRA 4M™ sex-sorted semen in timed artificial insemination programs for mature beef cows. *Theriogenology*, v. 123, p. 100-107, 2019.

WARD, F. et al. Effect of reducing sperm concentration during IVF on the ability to distinguish between bulls of high and low field fertility: work in progress. *Theriogenology*, v. 59, n. 7, p. 1575-1584, 2003.

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

WARD, Fabian et al. Paternal influence on the time of first embryonic cleavage post insemination and the implications for subsequent bovine embryo development in vitro and fertility in vivo. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, v. 60, n. 1, p. 47-55, 2001.

WILSON, R. D. et al. In vitro production of Holstein embryos using sex-sorted sperm and oocytes from selected cull cows. *Journal of dairy science*, v. 88, n. 2, p. 776-782, 2005.

XU, J. et al. Developmental potential of vitrified Holstein cattle embryos fertilized in vitro with sex-sorted sperm. *Journal of dairy science*, v. 89, n. 7, p. 2510-2518, 2006.

YUE A, Meng FJ, Jorgensen N, Ziebe S, Nyboe Andersen A. Sperm morphology using strict criteria after Percoll density separation: influence on cleavage and pregnancy rates after in vitro fertilization. *Human Reproduction*, 1995;10(7):1781–1785.

ZANATTA, Guilherme Machado. Produção embrionária utilizando touros de alta e baixa fertilidade. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

ZANDONAIDE, João Pedro Brandão. A AKAP4 do espermatozóide como biomarcador da fertilidade de touros. 2024. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 42 f. DOI <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2024.653>.

Aquidauana, MS / dezembro, 2025

A FERTILIDADE DE TOUROS A CAMPO É UM BOM INDICATIVO PARA O DESEMPENHO NA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES?

Taynara dos Santos Santana ⁽¹⁾, Fabiana de Andrade Melo Sterza ⁽²⁾, Eriklis Nogueira ⁽³⁾, Wiliam Aparecido Leite da Silva ⁽⁴⁾

⁽¹⁾ Mestranda, Programa de Pós-graduação em Zootecnia, Aquidauana, MS, ⁽²⁾ Professora doutora, Pós-graduação em Zootecnia, Aquidauana, MS, ⁽³⁾ Pesquisador EMBRAPA Gado de Corte, ⁽⁴⁾ Pós-doutorado, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

Introdução

A baixa eficiência reprodutiva pode afetar diretamente a rentabilidade da bovinocultura e afim de intensificar os sistemas de produção, a incorporação de biotecnologias reprodutivas se torna necessária. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) tem se destacado como uma ferramenta estratégica para a seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores (Steenefeld et al., 2024) e os bovinos têm sido o maior beneficiado (Ferré et al., 2020).

Embora a técnica seja bem estabelecida comercialmente, ainda existem limitações que levam a inconstâncias nos resultados. Dentre os diversos fatores que influenciam o sucesso da técnica, o potencial do touro é um ponto crucial para o sucesso da técnica.

A avaliação espermática convencional, não permite compreender plenamente os eventos do desenvolvimento embrionário *in vitro* nem identificar em que momento ocorrem as divergências entre touros (Morales et al., 2016), por isso os índices de fertilidade baseados nos

resultados a campo não são a melhor ferramenta para a seleção de touros para a fertilização *in vitro* de embriões.

Nesse contexto, vamos apresentar atualizações e reflexões sobre como selecionar sêmen mais fértil para a FIV.

Fertilidade

A palavra fertilidade origina-se do latim “*fertilitas*” que significa capacidade de produzir ou gerar frutos. Essa característica é considerada uma das mais relevantes para a eficiência produtiva dos rebanhos, sendo influenciada por fatores como nutrição, idade, genética e manejo.

São considerados púberes os machos que tenham concentração de 50 milhões de espermatozoides e ejaculado com no mínimo 10% de motilidade. A puberdade de touros zebuínos tem sido alcançada cada vez mais cedo (REF), assim como o seu uso em programas de melhoramento genético. Essa possibilidade

representa um ganho genético muito acelerado, mas também é um desafio para o desenvolvimento das biotecnologias da reprodução.

Segundo os critérios do CBRA (2013), o sêmen bovino descongelado, para ser considerado apto precisa ter motilidade progressiva superior a 30%, vigor espermático igual ou superior a 3, 70% ou mais de espermatozoides normais, menos de 10% de defeitos maiores e aproximadamente 10 milhões de espermatozoides por palheta.

No entanto, somente a avaliação desses fatores não é capaz de garantir e prever a fertilidade do touro, visto que a fertilidade engloba fatores como integridade do DNA espermático e capacidade de capacitação, resistência ao estresse oxidativo (Dias et al., 2009), entre outros. Diante disso, métodos mais acurados como a definição pela taxa de prenhez através da IATF, têm sido utilizados.

Atualmente, o método mais utilizado para se avaliar a fertilidade de um touro, é através das taxas de prenhez, ou taxas de não retorno ao cio, após as inseminações artificiais a campo (Larsson e Rodriguez-Martinez, 2000). No entanto, trata-se de um método de elevado custo e que demanda muito tempo para obtenção dos resultados.

Diversas empresas do ramo de comercialização de sêmen e melhoramento genético, tem desenvolvido sistemas próprios de classificação da fertilidade de touros. Atualmente, no Brasil, 5 centrais se destacam com os seus programas, sendo eles: Concept Plus, IFert®, IATF-Max®, PregCheck BR® e Fertility First®.

O índice IFert®, por exemplo, é um modelo estatístico, e na prática, o touro em avaliação é submetido ao teste junto com um touro de fertilidade conhecida, dentro de um mesmo grupo de fêmeas. E com isso estima-se que o touro tem desempenho significativamente superior, equivalente ou inferior à média de fertilidade do

grupo (CRV Brasil, 2023).

Os programas comerciais, tem papel fundamental na identificação de reprodutores, pois possuem grandes volumes de dados, de diversas propriedades e biomarcadores que permite uma estimativa mais acurada da fertilidade real do touro.

No entanto, considerando todo o potencial de evolução que a PIVE oferece, ainda não existe programa comercial que classifique os touros com base na sua fertilidade na Produção *in vitro*.

Fertilização *In Vitro*

A técnica, consiste na maturação *in vitro* de oócitos (MIV), a fertilização (FIV) propriamente dita e o cultivo *in vitro* (CIV), indo até a fase de blastocisto, que é a fase em que o embrião pode ser transferido para uma vaca receptora (mãe de aluguel). O processo desde a obtenção do oócito da vaca doadora até a transferência do embrião para a vaca receptora leva 8 dias.

O primeiro ponto para que se tenha sucesso na produção são os cuidados relacionados a doadora. Mello et al., (2016), demonstraram que a idade da doadora tem relação com a quantidade e qualidade de oócitos. Segundo Landry et al., (2016) novilhas demonstram melhores taxas de blastocisto na PIVE. A condição nutricional da fêmea também deve ser considerada, na escala de 1 a 5, sendo 1- Caquético e 5- obeso, sendo o escore de condição corporal 3 é considerado o mais adequado para a produção (Souza et al., 2023). Fatores como condições fisiológicas, genótipo e condições climáticas também influenciam na produção.

O sucesso na produção *in vitro* aumenta ao utilizar oócitos de melhor qualidade, que são aqueles que possuem mais camadas de células do cumulus compactas, Ooplasma com granações finas e homogêneas, preenchendo todo o interior da zona pelúcida.

Dentro do laboratório os cuidados permanecem e devem ser ainda mais criteriosos. Embora o protocolo de produção possa variar entre laboratórios, é comum que durante a MIV e FIV,

os oócitos sejam incubados em atmosfera controlada com 5% de CO₂, temperatura de 38,5 °C e alta umidade. Alguns protocolos já não são mais dependentes da atmosfera gasosa durante a MIV. Já na fase de CIV a composição gasosa da incubadora deve ser modificada para 5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% N₂, embora alguns laboratórios utilizem variações próximas de 6, 6 e 88% respectivamente.

Além disso, é fundamental que todas as manipulações sejam realizadas em ambiente limpo, baixa exposição a luz e com pouca corrente de ar, para evitar a entrada indesejada de qualquer impureza. Os materiais utilizados devem ser estéreis e específicos para cultivos de células, prevenindo a contaminação por microrganismos ou toxinas. Os meios de cultivo deverão ser armazenados de acordo com a recomendação do fabricante, preservando a sua composição e evitando a alteração do pH.

Entre os principais desafios da técnica, destaca-se a baixa taxa de conversão de oócitos em embriões, que atualmente é de aproximadamente 35%. Há também a grande variabilidade nos resultados entre diferentes doadoras e touros, pois determinados indivíduos respondem melhor a protocolos específicos. Além, dos custos de produção, que são elevados, por exigirem infraestrutura mais tecnológica e mão de obra especializada.

Por fim, é essencial um cuidado adequado com as receptoras, visto que serão as responsáveis por conduzir a gestação e garantir um nascimento e crescimento saudável da prole.

A fertilidade à FIV

Na FIV, a avaliação do desempenho dos reprodutores é realizada com base em dois principais indicadores, sendo eles a taxa de clivagem, geralmente observada 48 horas após a fertilização, e a taxa de blastocistos, avaliada no sétimo dia de cultivo.

Estudos tem demonstrado que as taxas de clivagem apresentam médias entre 65% a 80%, enquanto as taxas de embrião no sétimo dia é de

aproximadamente 30%. Touros que de forma consistente, apresentam taxa de blastocisto acima das medias observadas, podem ser considerados de alto desempenho *in vitro*, embora ainda não existam critérios objetivos ou índices oficiais de classificação, como os que existem para a fertilidade a campo.

No laboratório, o sêmen é submetido ao protocolo de capacitação o qual seleciona os espermatozoides moveis para a fecundação. Além do ajuste da dose inseminante, ao avaliar motilidade e vigor após Percoll.

Diante disso, diversos estudos têm buscado compreender a possível correlação entre o desempenho reprodutivo a campo e os resultados obtidos na PIVE.

As pesquisas apontam

Avaliamos 54 touros, de diferentes centrais, submetidos a rotinas comerciais pela empresa Cenatte Embriões®. Foram 376 doadoras e 6.576 oócitos cultivados.

Esses touros foram classificados de acordo com seus índices de fertilidade em grupos de alta e baixa fertilidade. 25 touros apresentavam índices de concepção entre 44% e 54% e foram classificados como de baixa fertilidade (BF) à IATF, enquanto 29 touros apresentaram de 58% a 63% de fertilidade e foram classificados como Alta fertilidade (AF).

As taxas de embriões produzidos, foram similares entre touros AF e BF (p=0,6124).

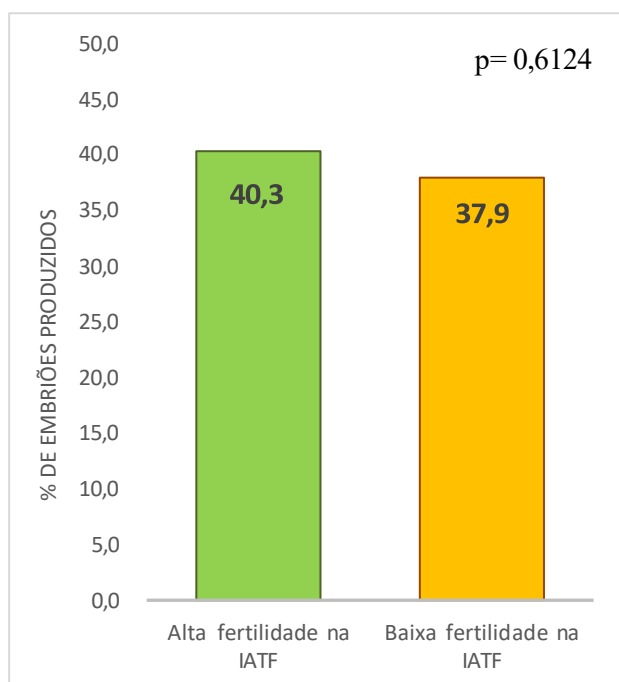


Figura 1 – Taxa de Blastocisto de embriões oriundo de touros de Alta e Baixa fertilidade a campo.

No grupo BF 8 dos 25 touros apresentaram baixo desempenho à FIV ($\leq 30,0\%$), com média de produção embrionária de 20,5%. Já os outros 17 touros do mesmo grupo tiveram desempenho superior ($\geq 41\%$), com média de 42,8%.

No grupo AF, 10 dos 29 touros também apresentaram baixo desempenho na PIVE, com média de produção de 21,6%. Os demais 19 touros desse grupo tiveram alto desempenho com média de 48,6%.

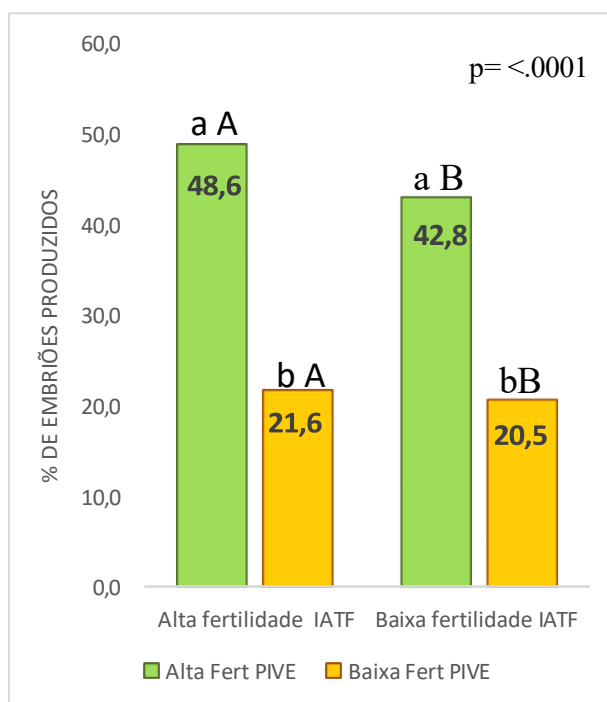


Figura 2 – Desempenho de touros de AF e BF, na PIVE.

Esses resultados indicam que a fertilidade a campo, por si só, não prediz diretamente o desempenho médio do sêmen na produção *in vitro* de embriões.

Em um estudo do nosso grupo (dados não publicados), utilizando na PIVE, 10 touros, 5 de alta e 5 de baixa fertilidade a campo, observamos que embriões oriundos de touros de baixa fertilidade apresentaram desenvolvimento inicial mais lento, especialmente nas primeiras clivagens (D4) e maior quantidade de gordura. Esse achado sugere que o efeito paterno pode não se manifestar na quantidade final de blastocistos produzidos, mas sim na dinâmica e na qualidade do desenvolvimento embrionário, aspecto que tem sido associado à competência embrionária e à viabilidade pós-criopreservação.

A literatura indica que embriões com clivagem inicial mais lenta geralmente apresentam menor probabilidade de atingir o estágio de blastocisto (Sugimura et al., 2017; Garcia et al., 2015). Contudo, trabalhos como o de Milazzotto et al. (2016) evidenciam que esses embriões podem exibir perfis de expressão gênica comparáveis aos de blastocistos gerados *in vivo*. Esses achados

sugerem que a velocidade de clivagem, por si só, não constitui um marcador definitivo da qualidade embrionária.

Dessa forma, os resultados reforçam que a fertilidade estimada a campo, embora essencial para programas de IATF, não são suficientes para prever o desempenho do sêmen em sistemas *in vitro*. Parâmetros como a cinética de desenvolvimento embrionário, a resistência à criopreservação e o potencial de estabelecimento de prenhez devem ser considerados para uma avaliação mais abrangente do impacto da fertilidade paterna na PIVE.

Baixa fertilidade a campo, alta eficiência na PIVE: implicações para a seleção de touros

Usar touros que apresentam baixa fertilidade a campo, mas bom desempenho na PIVE, pode representar uma oportunidade para programas de multiplicação genética, mas também apresenta limitações que devem ser consideradas.

A fertilidade é um traço com herdabilidade. Estudos apontam de baixa a moderada, dependendo do parâmetro avaliado. Isso demonstra que parte do potencial reprodutivo pode ser transmitido aos seus descendentes, por essa razão não é recomendada a utilização de reprodutores com esse perfil, caso o interesse seja produzir descendentes reprodutores.

Por outro lado, o touro de baixa fertilidade à campo, com alta fertilidade à FIV pode ser uma estratégia viável, quando se tem o objetivo de preservar ou multiplicar características zootécnicas de alto interesse, como ganho de peso, conformação de carcaça, onde o foco seja a produção de animais para abate e não a geração de futuros reprodutores.

Portanto, como ainda há muitas questões a serem esclarecidas a respeito da variação observada entre a fertilidade à campo e a *in vitro*,

sugere-se cautela na seleção dos touros em programa de PIVE, que tem capacidade de multiplicar de forma mais acelerada a genética dos indivíduos.

Referencias

- DE SOUSA, Laura Gabriela et al. Influência do escore corporal na seleção de doadoras de oócitos para produção de embriões. *Sinapse Múltipla*, v. 12, n. 1, p. 130-133, 2023.
- DIAS, Rosiara Rosária et al. Análise de sêmen bovino e sua relação com a fertilidade. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 6, p. 5-10, 2009.
- GARCIA, Sheila Merlo et al. Developmental block and programmed cell death in *Bos indicus* embryos: effects of protein supplementation source and developmental kinetics. *PloS One*, v. 10, n. 3, p. e0119463, 2015.
- LANDRY, David A. et al. Effect of cow age on the *in vitro* developmental competence of oocytes obtained after FSH stimulation and coasting treatments. *Theriogenology*, v. 86, n. 5, p. 1240-1246, 2016.
- LARSSON, B.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Can we use *in vitro* fertilization tests to predict semen fertility? *Animal Reproduction Science*, v. 60, p. 327-336, 2000.
- MAROTO-MORALES, Alejandro et al. Current status and potential of morphometric sperm analysis. *Asian Journal of Andrology*, v. 18, n. 6, p. 863-870, 2016.
- MELLO, Raquel Rodrigues Costa et al. Fatores ligados à doadora que influenciam na produção de embriões *in vitro* (PIVE). *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, p. 51-57, 2016.
- MILAZZOTTO, Marcella Pecora et al. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and Development*, v. 83, n. 4, p. 324-336, 2016.
- ORTEGA, M. Sofia et al. Influences of sire conception rate on pregnancy establishment in dairy cattle. *Biology of Reproduction*, v. 99, n. 6, p. 1244-1254, 2018.
- PORTAL DBO. Programas de fertilidade de touros de alto nível avançam no Brasil. [s.d.]. Disponível em: *Programas de fertilidade de touros de alto nível avançam no Brasil* • Portal DBO. Acesso em: 06 ago. 2025.
- SUGIMURA, Satoshi; AKAI, Tomonori; IMAI, Kei. Selection of viable *in vitro*-fertilized bovine embryos using time-lapse monitoring in microwell culture dishes. *Journal of Reproduction and Development*, v. 63, n. 4, p. 353-357, 2017.

CAPÍTULO 4 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo demonstraram que a fertilidade paterna determinada a campo, não influenciou na fecundação dos oócitos, porém os embriões oriundos do grupo BF apresentaram maior proporção de clivados lentos e posteriormente maior acúmulo lipídico, podendo comprometer a qualidade embrionária. No entanto, esse atraso inicial não comprometeu a capacidade dos embriões BF de atingirem o estágio de blastocisto em D7, além de apresentarem qualidade semelhantes aos embriões AF, ao se utilizar o número de células como preditor. O maior acúmulo lipídico encontrado no grupo BF, pode indicar alterações metabólicas e menor viabilidade embrionária, comprometendo estágios posteriores.

Sucintamente, embora a fertilidade paterna determinada a campo não interfira na produção de blastocisto, ela pode influenciar no metabolismo embrionário e na viabilidade do embrião. Além disso, os resultados sugerem que, em touros de baixa fertilidade a seleção de embriões rápidos (acima de 8 células em D4) pode permitir a seleção de blastocistos com menor conteúdo lipídico e, portanto, melhor sobrevivência a criopreservação.

Novos estudos são necessários para elucidar os mecanismos moleculares envolvidos nessa interação para identificar possíveis marcadores que auxiliem na predição de fertilidade dos touros, contribuindo para o aprimoramento das biotecnologias da reprodução.