

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV) PARA AVALIAÇÃO DA FERTILIDADE DE CAMUNDONGOS BALB/C

Tiago Calebe Godinho Monção^{1*}, Larissa Kennedy Moreira Freitas², Pedro Igor Macário Viana³, Leonardo Carvalho³ e Guilherme Mattos Jardim Costa⁴

¹Discente do Curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil – *Contato: tcgm22478@gmail.com

² Discente do Curso de Biomedicina – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

³ Discente do Programa de Pós-Graduação de Biologia Celular – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

⁴Docente do curso de Medicina Veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG – Belo Horizonte/MG – Brasil

INTRODUÇÃO

O espermatozoide, gameta masculino, apresenta relevante papel no processo de embriogênese, além da contribuição genômica haplóide paterna para a fertilização. Sua função está diretamente ligada à morfologia do espermatozoide, em que todos os seus componentes, a saber, cabeça, acrosoma, peça intermediária e cauda, estão relacionados ao processo adequado de fertilização, isto é, a união dos gametas masculinos e femininos para a formação do zigoto¹. Após este processo, a célula espermática continua a desempenhar diversas funções no desenvolvimento embrionário, como na ativação do oócito². Além disso, de maneira espécie-específica, o gameta paterno pode atuar no desenvolvimento do centríolo, organela essencial para a divisão celular³. O espermatozoide, ainda, está relacionado a manifestações epigenéticas no embrião por meio de metilação do DNA, modificações de histonas e acessibilidade da cromatina⁴. Considerando a sua diversidade de funções durante a embriogênese, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o protocolo de Fertilização *in Vitro* (FIV) em camundongos BALB/c, a fim de avaliar o impacto de espermatozoides produzidos de machos tratados com nanopartículas quanto à qualidade e ao desenvolvimento o embrionário.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e Superovulação das fêmeas

Para a realização deste trabalho, foram utilizados 3 camundongos fêmeas e 3 machos da linhagem BALB/c provenientes do Biotério Central da UFMG (CEUA 132/2023). Por um período de 20 dias, anterior à estimulação hormonal, estas fêmeas foram avaliadas diariamente, por meio de citologia vaginal realizada por lavado vaginal e coloração com panótico. A técnica foi empregada para classificá-las de acordo com seu posicionamento em seu ciclo estral. As fêmeas foram estadiadas em proestro, estro, metaestro e diestro⁵. A caracterização do estadiamento no ciclo estral permaneceu até que as fêmeas estivessem em diestro, momento no qual foram submetidas ao protocolo de superovulação⁶. A indução de superovulação nas fêmeas murinas foi realizada por meio da aplicação intraperitoneal (IP) de *equine chorionic gonadotropin* (eCG) 72 horas antes da eutanásia das fêmeas, seguida de *human chorionic gonadotropin* (hCG) 13 horas antes da eutanásia das fêmeas.

Coleta e processamento dos gametas

Para a coleta dos oócitos, os animais superovulados foram submetidos à eutanásia por *overdose* anestésica através de uma injeção IP (cetamina 240 mg/kg e xilazina 30 mg/kg). Após a dissecação do aparelho reprodutor das fêmeas, os ovários e tubas uterinas foram separados e os oócitos coletados. Os oócitos foram recuperados das tubas uterinas e acondicionados em gota de 200 µL de Meio CSCM-C (*Continuous Single Culture Medium Complete*) até o processo de fertilização. Em seguida os machos foram eutanasiados e o aparelho reprodutor foi coletado. O epidídimo direito foi separado e encaminhado ao processamento para a FIV e o esquerdo para a análise seminal pré-swim-up. Os espermatozoides foram coletados da cauda do epidídimo, em que foram avaliados quanto à motilidade. Após capacitação *in vitro* dos espermatozoides, 3 µL da gota de *swim-up* dos espermatozoides foi adicionada a placa contendo os oócitos recuperados e incubados por 4 horas. A incubação de todas as placas usadas no experimento foi feita em atmosfera a 5% de CO₂, a 37°C em meio de umidade saturada. Os embriões foram avaliados durante 5 dias quanto ao número de clivagens e à quantidade total de embriões que atingiram a fase de blastocisto.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados apresentados são referentes às etapas iniciais da FIV. Para tanto, ocorreu o pareamento de 3 fêmeas com 3 machos do grupo controle, isto é, machos murinos que não foram submetidos a nenhum tipo de tratamento com nanopartículas. Isto porque o objetivo do estudo é otimizar o processo de FIV, criando padrões para análises futuras, nas quais serão observados também os machos do grupo tratado.

As fêmeas foram dispostas na *Tabela 1* com o conjunto de ovócitos totais recuperados e também o total de ovócitos efetivamente analisados. Sendo que alguns ovócitos não se qualificavam para permanência em cultivo.

Tabela 1: Total de ovócitos recuperados e ovócitos efetivamente analisados. (Elaborado pelos autores, 2025)

Fêmea	Ovócitos recuperados	Ovócitos analisados	Ovócitos analisados/recuperados %
Fêmea 1	26	19	73,07
Fêmea 2	8	5	62,5
Fêmea 3	24	14	58,33

Os dados preliminares de contagem total de ovócitos permitiram identificar os efeitos da superovulação. A média obtida de ovócitos totais foi de 19,3. Este achado é similar aos descritos por GOLKAR-NARENJI et al (2012), no qual a média de ovócitos recuperados para fêmeas de BALB/c tratadas com protocolo hormonal similar foi de 19,4⁷. Apesar disso, houve variação significativa na contagem total de gametas femininos por fêmea, variando de 8 (Fêmea 2) a 26 (Fêmea 1), apresentando um desvio-padrão de 9,8, destacando variabilidades individuais das fêmeas perante o protocolo de superovulação.

Com relação à taxa de aproveitamento dos ovócitos, as fêmeas 1, 2 e 3 obtiveram taxas de oócitos analisados (isto é, considerados aptos para a permanência em cultivo), respectivamente, de 73,07%, 62,5% e 58,33%, com média de 64,63% (com 38 ovócitos analisados) para o aproveitamento dos gametas recuperados. Este dado é superior ao encontrado por GOLKAR-NARENJI et al (2012), quando se trata de ovócitos maduros, cuja porcentagem demonstrada foi de 45,6% em protocolo semelhante⁷.

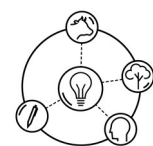
As *Tabelas 2 e 3* apresentam a análise seminal para machos controle avaliados, com enfoque para a motilidade, parâmetro essencial para a fertilização em mamíferos⁸, cujos resultados foram organizados em análise pré e pós *swim-up*.

Tabela 2: Análise da viabilidade espermática pré *swim-up* com avaliação da motilidade dos espermatozoides (Elaborado pelos autores, 2025).

Macho	Progressivo %	Não progressivo %	Imóvel %
Macho 1	42	21,5	36,5
Macho 2	37,5	19	43,5
Macho 3	59	12	29,5

Tabela 3: Análise da viabilidade espermática pós *swim-up* com avaliação da motilidade dos espermatozoides (Elaborado pelos autores, 2025).

XVI Colóquio Técnico Científico de Saúde Única, Ciências Agrárias e Meio Ambiente



Macho	Progressivo %	Não progressivo %	Imóvel %
Macho 1	61,5	14,5	24
Macho 2	50	25,5	24,5
Macho 3	57,5	12,5	30

Os resultados da viabilidade espermática anterior ao *swim-up* permitem caracterizar a qualidade dos gametas inicialmente, tomando como parâmetro principal a porcentagem de espermatozoides progressivos. A média encontrada na análise inicial foi de 43,16% de progressivos, tendo um desvio-padrão de 9,25%. Comparativamente, a média encontrada após o processamento dos espermatozoides no *swim-up* chegou a um patamar de 56,33% com um desvio-padrão de 4,76%.

Os dados demonstraram eficiência do procedimento de capacitação dos espermatozoides, como demonstrado pelo aumento significativo do principal parâmetro espermático, a motilidade progressiva. Embora o *n* amostral tenha sido significativamente menor, os dados de motilidade verificados superam os encontrados na literatura ao compará-los com modelo murino em processamento de gametas semelhantes⁸.

Tabela 4: Número total de Clivagens e Blastocistos. (Elaborado pelos autores, 2025)

Fêmea	Clivagens	Blastocistos
Fêmea 1	5	1
Fêmea 2	0	0
Fêmea 3	2	0

Ao considerar as três fêmeas pareadas com os machos controle, é possível observar baixo número de clivagens em relação ao total de ovócitos de fato analisados (7 clivagens de 38 ovócitos, ou 18,42%), bem como apenas a formação de um único blastocisto, como observado na *Tabela 4*. Tais dados evidenciam taxas de clivagens inferiores às reportadas na literatura, as quais variam entre 41,2% e 65,2% em protocolos de FIV em camundongos de mesma linhagem que a utilizada no presente trabalho, BALB/c^{7,9}.

A performance, considerada inferior para as taxas de fertilização, permite visualizar a alta complexidade dos protocolos de FIV para o modelo murino utilizado. O que demonstra sensibilidade do protocolo e necessidade de otimização contínua, visto que o objetivo final deste procedimento é o estudo futuro da contribuição dos gametas masculinos para o desenvolvimento embrionário, ou seja, a análise do grupo tratado com nanopartículas em trabalhos posteriores.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A FIV em camundongos utiliza gametas coletados a partir dos animais previamente superovulados. Os dados referentes à recuperação de ovócitos e à taxa de aproveitamento do presente estudo inicial demonstraram-se promissores para o protocolo hormonal para superestimulação ovariana das fêmeas. Os resultados acerca do sucesso da fertilização, no entanto, mostraram-se inferiores aos descritos na literatura, o que demonstra a importância da otimização do processo ampliando o *n* amostral, a fim de validá-lo para a avaliação da fertilidade dos machos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 – MOORE, K. L. et al. **Embriologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2022.
- 2 – KASHIR, J. et al. **Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility**. Human Reproduction Update, Vol. 17, No. 4, pp. 513–524, junho de 2011.
- 3 – AVIDOR-REISS, T. et al. **The Sperm Centrioles**. Frontiers in Cell and Developmental Biology, Vol. 8, dezembro de 2020.

4 – VALLET-BUISAN, M. et al. **Contribution of semen to early embryo development: fertilization and beyond**. Human Reproduction Update, Vol.29, No.4, pp. 395–433, março de 2023.

5 – McLean, A. C. et al. **Performing Vaginal Lavage, Crystal Violet Staining, and Vaginal Cytological Evaluation for Mouse Estrous Cycle Staging Identification**. J. Vis. Exp., Vol. 67, setembro de 2012.

6 – VASEGHI, H. **Super pregnancy in a BALB/c mouse superovulated with PMSG**. Reproductive Medicine and Biology, Vol. 16, pp. 418–422, setembro de 2017.

7 – GOLKAR-NARENJI, A. et al. **Superovulation, in vitro fertilization (IVF) and in vitro development (IVD) protocols for inbred BALB/cJ mice in comparison with outbred NMRI mice**. Reprod Med Biol, Vol. 11, pp. 185-192, abril de 2012.

8 – VIEIRA, C. P. et al. **Optimization of spermatozoa analysis in mice: A comprehensive protocol**. Tissue and Cell, Vol. 89, 2024.

9 – HOGAN, B. et al. **Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

APOIO:

