



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)  
REALIZADO NO LABORATÓRIO DE EMBRIÕES BOVINOS – UNIVERSIDADE  
DA FLÓRIDA, GAINESVILLE - FL, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE MODULADORES DE cAMP DURANTE A  
PRÉ-MATURAÇÃO *IN VITRO* NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

**RAQUEL DESENZI PESSOA**

**RECIFE**

**2022.1**



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)  
REALIZADO NO LABORATÓRIO DE EMBRIÕES BOVINOS – UNIVERSIDADE  
DA FLÓRIDA, GAINESVILLE - FL, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE MODULADORES DE cAMP DURANTE A  
PRÉ-MATURAÇÃO *IN VITRO* NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Relatório de Estágio Supervisionado Obrigatório apresentado ao curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Bacharel em Medicina Veterinária, sob a Orientação do Prof. Dr. André Mariano Batista, Supervisão do Prof. Dr. Peter James Hansen.

**RAQUEL DESENZI PESSOA**

**RECIFE**

**2022.1**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

D451r Pessoa, Raquel Desenzi  
RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO) REALIZADO NO  
LABORATÓRIO DE EMBRIÕES BOVINOS – UNIVERSIDADE DA FLÓRIDA, GAINESVILLE - FL,  
ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA: EFEITO DA ADIÇÃO DE MODULADORES DE cAMP DURANTE  
A PRÉ-MATURAÇÃO IN VITRO NA PRODUÇÃO  
DE EMBRIÕES BOVINOS / Raquel Desenzi Pessoa. - 2023.  
51 f. : il.

Orientador: Andre  
Mariano Batista. Inclui  
referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Bacharelado em Medicina Veterinária, Recife, 2023.

1. cAMP. 2. pré-maturação. 3. oocitária. 4. ovário. 5. bovino. I. Batista, Andre Mariano, orient. II. Título

---

CDD 636.089



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)  
REALIZADO NO LABORATÓRIO DE EMBRIÕES BOVINOS – UNIVERSIDADE  
DA FLÓRIDA, GAINESVILLE - FL, ESTADOS UNIDOS DA AMÉRICA**

**EFEITO DA ADIÇÃO DE MODULADORES DE cAMP DURANTE A  
PRÉ-MATURAÇÃO *IN VITRO* NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

Relatório elaborado por  
**RAQUEL DESENZI PESSOA**

Aprovado em 28/04/2023

**Banca Examinadora**

---

Prof. Dr. André Mariano Batista  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

---

Prof. Dr. Claudio Coutinho Bartolomeu  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

---

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro  
Departamento de Medicina Veterinária - UFRPE

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho a meus avós  
Nelson Pessoa (in memoriam) e  
Deogracia Desenzi (in memoriam)  
por acreditarem em mim e me  
incentivarem a seguir esse sonho.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a mim, por sempre acreditar na minha capacidade, não me permitir desistir e desde criança persistir no sonho de me graduar em Medicina Veterinária.

À toda minha família, em especial a meus pais Naelson e Delane, que nunca pouparam esforços para que pudessem me proporcionar uma boa educação e sempre me apoiaram a seguir meus sonhos. Sinto muito orgulho e admiração pelos pais excepcionais que tenho, amo vocês imensamente.

À Severina, que cuidou de mim desde muito pequena, ensinou-me a amar os animais com toda sua pureza e que sempre fez questão de participar da minha formação, perguntando-me sobre o que eu aprendia e sempre pedindo pra que eu mandasse fotos abraçada aos animais pra poder guardar de recordação.

À minha avó Deogracia (*in memoriam*) que buscava sempre me proporcionar momentos em que eu me apaixonasse desde muito nova pelos animais, quando íamos à fazenda São Roque e ela fazia questão de ir comigo ver seu apiário, os cavalos, as cabras, as carpas e girinos do laguinho. Além disso, fez de mim a estagiária mais nova da veterinária, que nos meus 10 anos costurou um mini jaleco bordado “mini estagiária Raquel Desenzi”, o qual tenho até os dias atuais e levarei pra sempre comigo!

O meu avô Naelson (*in memoriam*) por ter construído na minha infância a paixão por animais de grande porte, levando-me ao curral pra mexer no gado, ao aprisco pra dar leite as cabras e até mesmo deixando os netos brincando numa mini charrete com um jumentinho ranzinza na fazenda em Gravata do Ibiapina. Lembranças que sempre guardarei em meu coração!

Agradeço aos meus colegas de turma, principalmente aos meus miguinhos Alicia, Alydyanny, Jessica, Karollainy, Lucas e Renata do grupo “Esquizocitos” por suportarem meu ranço toda manhã, sempre com muito carinho, muitas risadas, muitos momentos de desespero, muitas noites do pijama pra estudar e o suporte que eu tive durante todo o curso. Vocês foram essenciais nessa jornada!

Aos meus amigos da escola Adria, Beatriz, Fábio, Jeceny, Nicole e Vinicius que vivenciaram desde que ingressei no curso até o atual momento, sempre sendo a minha válvula de escape fora da universidade, nas raras ocasiões em que conseguíamos nos encontrar. Amo vocês minhas meninas!

Ao meu namorado Gabriel, que segurou minha mão nos meus momentos mais frágeis e sempre me incentivou a acreditar em mim mesma, acima de tudo. Obrigada por sempre exaltar o orgulho que sente de mim, tentar me ajudar, independente do seu conhecimento no assunto e sempre se fazer presente no laboratório, a campo e nos momentos de descontração. Amo você sempre!

Agradeço ao Dr. Hansen e a equipe do *Bovine Embryo Lab* pela oportunidade e por todos os ensinamentos que obtive durante o período em que realizei o ESO. Assim como à Theresa, por toda companhia e suporte que me ofereceu em sua casa.

A todos os professores do curso de Medicina Veterinária, os quais tive a honra de poder aprender com suas experiências e ensinamentos durante toda a graduação, de forma que todos foram essenciais para a construção dos meus conhecimentos e da minha formação.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biotécnicas Aplicadas a Reprodução (LBR-UFRPE) por estar lado a lado na área da pesquisa, auxiliando e construindo juntos um local de trabalho repleto de ciência, estudo e muito bolo com café.

Agradeço a meu grande amigo Rafael, por aguentar meus surtos, minhas crises emocionais e me ensinar com a sua didática maravilhosa como a reprodução é linda!

Ao meu orientador Prof. André, por me orientar desde 2020 de uma forma tão amigável, atenciosa e muitas vezes enfática em todos os aspectos da minha vida, com muitos puxões de orelha, mas também com muito reconhecimento. Obrigada por ter sido um grande orientador, professor e amigo, ao senhor toda minha admiração!

Agradeço aos meus animais de estimação, os quais tenho como filhos, Loki, Lola, Milkshake, Thor, Kuki (*in memorian*), Areta (*in memorian*) e Pongo (*in memorian*) por toda companhia, suporte emocional e disponibilidade para a ampliação do meu conhecimento durante a graduação.

Por fim, agradeço a todos aqueles que um dia cruzaram meu caminho e me ensinaram de alguma forma ensinamentos, técnicas, condutas e concepções que carregarei comigo para sempre, tanto no âmbito profissional quanto no pessoal.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Laboratório de Embriões Bovinos da Universidade da Florida
- Figura 2.** Área de Análise Biomolecular (Laboratório Principal)
- Figura 3.** Acesso a Câmara Frigorífica (Laboratório Principal)
- Figura 4.** Câmara Frigorífica
- Figura 5.** Área Suja do Laboratório de FIV
- Figura 6.** Área Limpa do Laboratório de FIV
- Figura 7.** Bancada do Laboratório de FIV
- Figura 8.** Pipeta Eletrônica
- Figura 9.** Estufa de Bancada
- Figura 10.** Termociclador
- Figura 11.** Preparação de Meios
- Figura 12.** Técnica de *Snapfreeze* em Blastocistos
- Figura 13.** Filtração de Aspirado Folicular
- Figura 14.** Coleta de Sangue
- Figura 15.** Mecanismo de ação do cGMP sobre a regulação dos níveis de cAMP
- Figura 16.** Separação dos Ovários para *Slashing*
- Figura 17.** Processo de *Slashing*
- Figura 18.** Desenho Experimental da MIV
- Figura 19.** Placas de Pré-Maturação
- Figura 20.** Placa de Maturação
- Figura 21.** Desenho Experimental da FIV
- Figura 22.** Placa de Cultivo
- Figura 23.** Embriões Clivados

## LISTA DE GRÁFICOS

**Gráfico 1.** Expressão Gênica de Blastocistos

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Sequência de *primers* usados para realizar RT-PCR
- Tabela 2** Estruturas cultivadas, clivadas, blastocistos produzidos e taxa de clivagem

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
cDNA	DNA complementar
cGMP	Monofosfato de guanosina cíclico
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i>
CO <sub>2</sub>	Dioxido de carbono
COC's	Complexo <i>cummulus</i> oócitos
dbcAMP	Dibutiril monofosfato cíclico de adenosina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EGF	Fator de crescimento epidérmico
ESO	Estágio Supervisionado Obrigatorio
FIV	Fertilização <i>In Vitro</i>
FPM	Fator promotor da meiose
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Grama
H	Horas
IBMX	3-isobutil-1-metilxantina
IGF	Fator de crescimento semelhante a insulina
LH	Hormônio luteinizante
MCI	Massa celular interna
Min	Minutos
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
Mg	Miligrama
μl	Microlitro
ml	Mililitro
μm	Micrometro
Mm	Milímetro
MOFA	Meio de coleta de oócitos
N <sub>2</sub>	Nitrogênio

NaCl	Cloreto de sódio
O <sub>2</sub>	Oxigênio
°C	Graus <i>Celcius</i>
OMI	Inibidor de maturação oocitária
OMM	Meio de maturação oocitário
OPU	<i>Ovum Pick-Up</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE	Fosfodiesterase
pH	Potencial hidrogeniônico
PHE	Penicilina; Hipotaurina; Epinefrina
PIV	Produção <i>In Vitro</i>
PIVE	Produção <i>In Vitro</i> de embriões
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase em tempo real
SFB	Soro fetal bovino
SOF	Fluido sintético de oviduto
TALP	Tiroide Albumina Lactato Piruvato
TCM	Meio de cultura de tecidos
TE	Trofectoderma

## RESUMO

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) em Medicina Veterinária foi realizado na área de Reprodução Animal com ênfase em Produção *In Vitro* de Embriões (PIVE) no *Bovine Embryo Lab* (Laboratório de Embriões Bovinos), da Universidade da Florida, no período de 06 de Novembro de 2022 a 27 de Janeiro de 2023, de segunda à sexta-feira, com carga horária de 40 horas semanais, perfazendo um total de 420 horas. As atividades de estágio foram coordenadas pelo orientador Prof. Dr. André Mariano Batista, professor adjunto da UFRPE, e pelo supervisor Dr. Peter James Hansen, professor titular na Universidade da Florida. No ESO foi vivenciada a rotina do Laboratório de Embriões Bovinos, desde preparação dos meios, produção de embriões *in vitro*, até análise das células por reação em cadeia da polimerase (PCR). Durante o período de estágio, além das diversas atividades de rotina e acompanhamento das pesquisas em curso no laboratório, foi possível conduzir um experimento sob minha responsabilidade. Portanto, o presente relatório tem por objetivo descrever as atividades vivenciadas durante a realização do ESO, bem como descrever os resultados do estudo que teve por objetivo avaliar a ação de moduladores de cAMP (monofosfato de adenosina cíclico) durante a pré-maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Sendo a pré-maturação *in vitro* a etapa utilizada para investigar os efeitos do adiamento da retomada da meiose por meio de moduladores, de forma que oócito obtenha a maturação citoplasmática completa e conseqüentemente alcance a competência oocitária para seu desenvolvimento subsequente. Ovários bovinos foram coletados em abatedouros comerciais e os oócitos obtidos, pelo método de *slashing*, foram subsequentemente divididos entre os seguintes grupos experimentais: grupo controle, sem adição de moduladores, e o grupo tratado contendo 22 µg/mL de IBMX e 49 µg/mL de dbcAMP, em meio de pré-maturação (TCM199/Bicarbonato, suplementado com glutamina, piruvato de sódio, *Pen/Strep* e soro fetal bovino), cultivados por 2 horas a 38,5 °C e 5% de CO<sub>2</sub> em umidade máxima. Para critério de avaliação, consideramos as taxas de desenvolvimento embrionário inicial e a expressão de genes de manutenção pela técnica de RT-PCR de cada grupo. Os resultados demonstraram que a exposição aos moduladores durante a pré-maturação oocitária *in vitro* não afetou as taxas de blastocistos, como refletido pela ausência de diferença significativa ( $P > 0,05$ ), entre os grupos. A adição dos moduladores também não afetou a expressão gênica, não demonstrando resultados diferentes entre os grupos. Conclui-se que, nas condições experimentais do presente estudo, que a adição de moduladores de cAMP durante a pré-maturação *in vitro* de oócitos bovinos, não afeta a taxa de produção de blastocistos, nem altera a expressão de genes relacionados à qualidade embrionária. Portanto, a experiência do ESO trouxe a oportunidade de aprender, vivenciar e executar atividades enriquecedoras no âmbito pessoal e profissional dentro da área de reprodução animal.

**Palavras-chave:** cAMP, pré-maturação oocitária, ovário, bovino.

## ABSTRACT

The Mandatory Supervised Internship (ESO) in Veterinary Medicine was carried out in the area of Animal Reproduction with emphasis on *In Vitro* Embryo Production (PIVE) at the *Bovine Embryo Lab*, at the University of Florida, from November 6<sup>th</sup> 2022 to January 27<sup>th</sup> 2023, from Monday to Friday, with a weekly workload of 40 hours, totaling 420 hours. The internship activities were coordinated by the advisor Prof. Dr. André Mariano Batista, associate professor at UFRPE, and supervisor Dr. Peter James Hansen, a tenured professor at the University of Florida. At ESO, the routine of the Bovine Embryo Laboratory was experienced, from media preparation, *in vitro* embryo production, to cell analysis by polymerase chain reaction (PCR). During the internship period, in addition to the various routine activities and monitoring of ongoing research in the laboratory, it was possible to conduct an experiment under my responsibility. Therefore, this report aims to describe the activities experienced during the ESO, as well as to describe the results of the study that aimed to evaluate the action of cAMP (cyclic adenosine monophosphate) modulators during *in vitro* pre-maturation of bovine oocytes. Pre-maturation *in vitro* is the step used to investigate the effects of postponing the resumption of meiosis by addition of modulators, so the oocyte obtains complete cytoplasmic maturation and consequently reaches oocyte competence for its subsequent development. Bovine ovaries were collected in commercial slaughterhouses and the oocytes obtained by the *slashing* method were subsequently divided into the following experimental groups: control group, without addition of modulators, and the treated group containing 22 µg/mL of IBMX and 49 µg/mL of dbcAMP, in pre-maturation medium (TCM199/Bicarbonate, supplemented with glutamine, sodium pyruvate, *Pen/Strep* and fetal bovine serum), cultivated for 2 hours at 38.5 °C and 5% CO<sub>2</sub> at maximum humidity. For evaluation criteria, we considered the initial embryonic development rates and the expression of maintenance genes by the RT-PCR technique of each group. Results demonstrated that exposure to modulators during oocyte pre-maturation *in vitro* did not affect blastocyst rates, as reflected by the lack of significant difference ( $P > 0.05$ ) between groups. The addition of modulators also did not affect gene expression, not demonstrating different results between groups. It is concluded that, under the experimental conditions of the present study, the addition of cAMP modulators during *in vitro* pre-maturation of bovine oocytes does not affect the rate of blastocyst production, nor alter the expression of genes related to embryo quality. Therefore, the ESO experience brought the opportunity to learn, experience and perform enriching activities in the personal and professional scope within the area of animal reproduction.

**Keywords:** cAMP, oocyte pre-maturation, ovary, bovine

## SUMÁRIO

### **CAPÍTULO 1: DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO 15**

#### **1 INTRODUÇÃO 16**

#### **2 DESCRIÇÃO DO LOCAL DE ESTAGIO 17**

2.1 Laboratório de Embriões Bovinos (*Embryo Bovine Lab*) da Universidade da Florida

2.2 Atividades Desenvolvidas 22

### **CAPÍTULO 2: EFEITO DA ADIÇÃO DE MODULADORES DE cAMP DURANTE A PRÉ-MATURAÇÃO *IN VITRO* NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS 24**

#### **1 INTRODUÇÃO 25**

#### **2 REVISÃO DE LITERATURA 26**

2.1 Maturação *In Vitro* 26

2.1.1 Maturação Oocitária 27

2.1.2 Mecanismo de ação do cAMP 28

2.1.3 Pré-Maturação *In Vitro* e o uso de moduladores 29

2.1.3.1 IBMX 30

2.1.3.1 dbcAMP 31

2.2 Fertilização *In Vitro* 31

2.3 Cultivo *In Vitro* 32

2.4 RT-PCR em células embrionárias 33

#### **3 METODOLOGIA 34**

#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41**

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS 45**

### **REFERÊNCIAS 46**

**CAPÍTULO 1: DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES REALIZADAS DURANTE O  
ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO**

## 1. INTRODUÇÃO

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) se define como a última fase do curso de Bacharelado em Medicina Veterinária na Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sendo parte das exigências para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária. De forma geral, o estudante tem o direito de realizar o ESO em um ou mais locais diferentes na mesma área, ou em áreas diferentes, e isso deverá ser cumprido em 420 horas de atividades desenvolvidas e, posteriormente apresentadas em um Trabalho de Conclusão de Curso (TCC). Previamente determinado, optou-se por realizar o ESO em apenas um local com 420 horas de atividades no total, no período de 06 de Novembro de 2022 à 27 de Janeiro de 2023, no Laboratório de Embriões Bovinos (*Bovine Embryo Lab*) na Universidade da Florida, Gainesville-EUA. A área escolhida foi a de Reprodução Animal com ênfase em Produção *In Vitro* de Embriões, sob orientação do professor André Mariano Batista da UFRPE e supervisão do professor Peter James Hansen da Universidade da Florida.

## **2. DESCRIÇÃO DO LOCAL DO ESO E ATIVIDADES DESENVOLVIDAS**

### **2.1. Laboratório de Embriões Bovinos (*Bovine Embryo Lab*) da Universidade da Florida**

O Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO) foi realizado no Laboratório de Embriões Bovinos (*Bovine Embryo Lab*) da Universidade da Florida, localizado no Departamento de Ciência Animal (*Animal Science Department*), na área de Reprodução Animal com ênfase em Produção *In Vitro* de Embriões, no período de 06 de Novembro de 2022 a 27 de Janeiro de 2023, totalizando uma carga horária de 420 horas, sob a supervisão do professor Peter James Hansen. No Laboratório de Embriões Bovinos foi possível acompanhar diversas atividades voltadas à reprodução de bovinos, como: aspiração folicular (*Ovum Pick Up* - OPU), para produção *in vitro* de embriões de raças de corte e de leite; coleta de materiais biológicos para dosagem de substâncias e hormônios, assim como procedimentos envolvendo biologia molecular utilizados nas análises de PCR.

Optou-se pelo Laboratório de Embriões Bovinos para ser o local de estágio, por ser um laboratório de referência na área, assim como, por oferecer estrutura física que contribui para maior eficiência nos processos de PIVE de forma que os alunos e estagiários tinham a oportunidade de acompanhar e realizar todas as etapas, além de aprender, na prática, diversas técnicas que a área em questão dispõe.

O local conta com três áreas principais: o laboratório principal (*Main Lab*); câmara frigorífica (*Walk-In Fridge*) e o laboratório de FIV (*IVF Lab*), Figura 1. O laboratório principal dispõe de amplo espaço para preparação de meios e reagentes, área para análise biomolecular (Figura 2) e acesso externo à câmara frigorífica (Figura 3), que se mantinha à temperatura de 4 °C para armazenamento e manipulação dos meios e reagentes (Figura 4). O laboratório de FIV divide-se em área suja (Figura 5) na qual se realizava o manuseio dos materiais oriundos do abatedouro, e a área limpa (Figura 6) utilizada exclusivamente para procedimentos de PIVE.



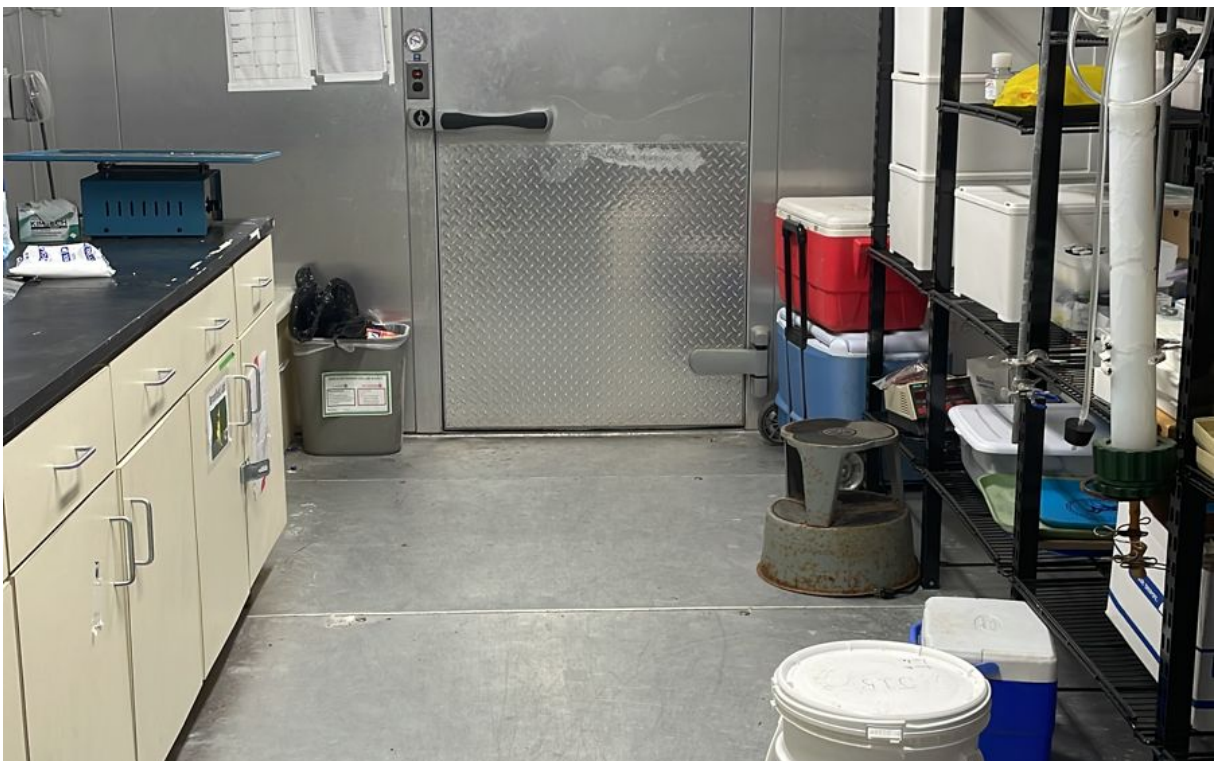
**Figura 1.** Laboratório de Embriões Bovinos da Universidade da Florida. A direita observa-se a entrada do laboratório principal (*Main Lab*), ao centro a câmara frigorífica (*Walk-in Fridge*) e a esquerda laboratório de FIV (*IVF Lab*). Fonte: Autora (2023).



**Figura 2.** Área destinada para análise biomolecular no laboratório principal do Laboratório de Embriões Bovinos, Universidade da Florida. Fonte: Autora (2023).



**Figura 3.** Acesso direto a câmara frigorífica na área interna do laboratório principal do Laboratório de Embriões Bovinos, Universidade da Florida. Fonte: Autora (2023).



**Figura 4.** Área interna da câmara frigorífica do Laboratório de Embriões Bovinos, Universidade da Florida. Fonte: Autora (2023).



**Figura 5.** Área suja para preparo e manipulação dos ovários do Laboratório de FIV, do Laboratório de Embriões Bovinos, Universidade da Florida. Fonte: Autora (2023).



**Figura 6.** Área limpa do laboratório de FIV onde realizava-se todas as etapas da PIVE, do Laboratório de Embriões Bovinos, Universidade da Florida. Fonte: Autora (2023).

O laboratório conta com equipamentos necessários para realizar todas as etapas do processo de produção de embriões bovinos, sendo eles: estufa de atmosfera controlada, estereomicroscópios (Figura 7), capela de fluxo contínuo para manipulação dos meios, pipetas de diversos volumes, pipeta automática (Figura 8), vórtex, estufa de bancada com mistura de gases (Figura 9), entre outros. Além disso, o local possui equipamentos e materiais para efetuar análise biomolecular de tecidos e células, tais como kits de extração de RNA e síntese de cDNA, capelas, nano espectrofotômetro e termociclador (Figura 10).



**Figura 7.** Bancada do laboratório de FIV contendo estereomicroscópio para embriões, placa aquecedora, pipetas, entre outros. **Figura 8.** Manipulação de meio com pipeta eletrônica em fluxo laminar. **Figura 9.** Estufa de

bancada com mistura de gases para cultivo de embriões. **Figura 10.** Termociclador para realização de PCR em células embrionárias. Fonte: Autora (2023).

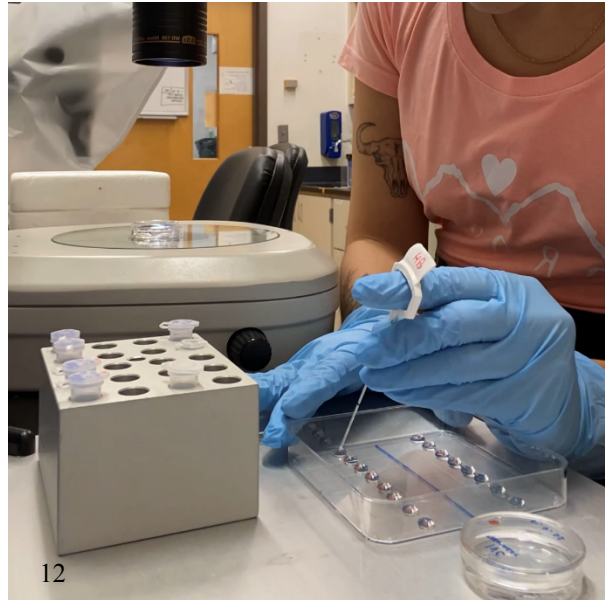
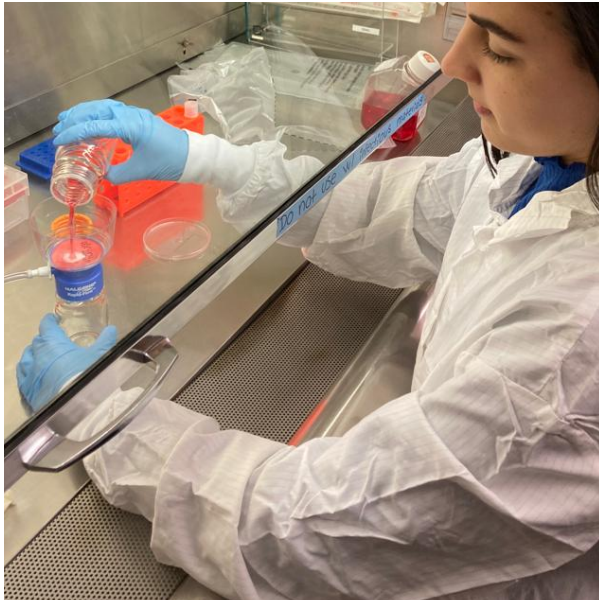
## 2.2. Atividades Desenvolvidas

Durante o período de estágio no Laboratório de Embriões Bovinos na Universidade da Florida foi possível participar de todas as etapas e procedimentos que envolvem a produção *in vitro* de embriões bovinos, desde a definição do protocolo de PIVE, meios e reagentes a serem utilizados, coleta de oócitos por meio de OPU ou de ovários oriundos de abatedouro, realização de todas as etapas, sendo elas maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de forma autônoma, com supervisão, até realizar análises biomoleculares nos embriões produzidos.

Como parte da rotina do laboratório, realizava-se a manipulação dos meios e soluções estoques uma vez no mês ou quando os mesmos eram finalizados antes do prazo de vencimento (Figura 11); preparação dos materiais utilizados a cada bateria de produção de embriões; anotação dos dados obtidos em cada etapa na plataforma online compartilhada (*Microsoft Teams*) e discussão dos resultados uma vez por semana, durante reunião conjunta de todos os membros do laboratório.

As baterias se iniciavam no procedimento de *slashing*, método para coleta de oócitos onde rompe-se a parede folicular utilizando lâmina de bisturi, que ocorria de segunda à sexta e cada integrante do laboratório realizava em torno de duas baterias por semana, evitando o choque nos horários entre as etapas seguintes de cada bateria. Para o *slashing*, era preparado no dia anterior o material para a coleta dos ovários no abatedouro, assim como os materiais para o procedimento propriamente dito, e após o *slashing*, realizava-se todo o processo da MIV.

Após 22h de incubação dos complexos *cumulus* oócitos (COC's), era realizado todo o processo de FIV, capacitação espermática de sêmen bovino congelado e cultivo dos gametas por 18 horas, em seguida os possíveis zigotos desnudos e lavados para posteriormente realizar-se a etapa de CIV por 6 dias. Por fim, era realizado o congelamento (Figura 12) e análise biomolecular dos blastocistos produzidos.



**Figura 11.** Preparação dos meios estoques utilizados durante as baterias na rotina de PIVE. **Figura 12.** Processo de congelamento dos blastocistos por meio da técnica de *snappfreeze*. Fonte: Autora (2023)

Ademais às atividades realizadas em laboratório, ocorriam práticas a campo. Foi possível acompanhar experimentos com aspiração folicular (OPU) e as etapas seguintes para realização de FIV dos COC's recuperados durante o procedimento (Figura 13), assim como coleta de material biológico para dosagem hormonal e análise metabólica (Figura 14).



**Figura 13.** Procedimento de filtração após aspiração folicular no processo de OPU. **Figura 14.** Coleta de sangue em touros Brahman pertencentes a experimento do laboratório. Fonte: Autora (2023).

**CAPÍTULO 2: EFEITO DA ADIÇÃO DE MODULADORES DE cAMP DURANTE A  
PRÉ-MATURAÇÃO *IN VITRO* NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS**

## 1. INTRODUÇÃO

A biotécnica reprodutiva de produção *in vitro* de embriões na espécie bovina se encontra em constante desenvolvimento em todas suas etapas, desde o momento em que veio a termo o primeiro embrião bovino produzido inteiramente em laboratório na década de 1980, até os dias atuais, onde a técnica se tornou largamente utilizada de forma comercial (Moore e Hasler, 2017). Com isso, torna-se cada vez mais necessário o conhecimento dos mecanismos que ainda não são claramente elucidados e que podem auxiliar na solução de fatores que limitam melhores resultados, como taxas de implantação e concepção, criotolerância dos embriões e a qualidade dos oócitos após o processo de maturação *in vitro* (Ferré et al., 2020; Wooldridge et al., 2022).

Os oócitos passam por mudanças nucleares e citoplasmáticas durante o processo de retomada de progressão meiótica que se tornam fundamentais na aquisição da competência oocitária, refletindo, subsequentemente, na capacidade de se desenvolver até o estágio de blastocisto, estabelecer uma gestação e dar continuidade até o nascimento de um animal saudável (Roelen, 2020). A parada meiótica é controlada por uma série de fatores, sendo um deles os níveis de cAMP intraoocitário que se mantêm elevados pela comunicação entre as células da granulosa da parede folicular e as células do *cumulus* que circundam o oócito, após a retirada artificial do oócito do folículo para PIVE, os níveis de cAMP caem de forma abrupta, promovendo a retomada repentina da meiose e interferindo na aquisição correta de competência oocitária (Lonergan e Fair, 2016).

Com o propósito de diminuir os efeitos da progressão meiótica antecipada, o uso de inibidores meióticos que regulam os níveis de cAMP foi aderido durante determinado período de tempo antes da MIV, numa fase de pré-maturação (pré-MIV), para que o oócito pudesse atingir a maturação citoplasmática adequada (Gilchrist et al., 2016).

Posto isso, o objetivo desse estudo é elucidar e melhorar a compreensão dos efeitos potenciais da adição de IBMX e dbcAMP durante a etapa de pré-maturação *in vitro* sobre o oócito no desenvolvimento embrionário inicial na espécie bovina, conferindo implicações importantes para melhorias e adaptações dos meios de cultura de MIV, podendo se estender a outras diferentes espécies, incluindo a humana.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. *Maturação In Vitro*

A MIV se dá início no procedimento de coleta dos COC's recuperados de folículos ovarianos de fêmeas da espécie bovina, que podem ser obtidos por meio de técnicas realizadas *in vivo*, como a aspiração folicular por meio de OPU, utilizando agulha acoplada à uma bomba a vácuo guiada por ultrassom (Ferré et al., 2022); ou através da punção folicular com agulha ou *slashing* (corte ou dissecação do folículo) nos ovários oriundos de abatedouros (*post-mortem*), sendo esta uma opção mais acessível e abundante (Bernal et al., 2015). Com isso, as técnicas *post-mortem* se tornam aplicadas com maior frequência para fins de pesquisa e melhoria das condições de PIVE, apesar da falta de conhecimento exato das condições genéticas, fisiológicas e sanitárias do material coletado (Lonergan e Fair, 2016).

Os COC's recuperados são avaliados quanto à qualidade e podem ser classificados em quatro graus distintos (GI, GII, GIII e GIV), dentro dos critérios propostos por Gonçalves et al. (2021) adaptado de Leibfried e First (1979). Os oócitos que enquadram-se na qualidade um (GI), sendo considerados como oócitos íntegros, apresentam citoplasma com granulações finas e homogêneas, zona pelúcida bem delimitada e envoltos, por completo, por três ou mais camadas de células do *cumulus*, são julgados como excelentes e que apresentam maiores chances de obter boas taxas de maturação. Oócitos de qualidade dois (GII), apresentam citoplasma com granulações dispostas heterogeneamente e menos de três camadas de células do *cumulus*. Oócitos de qualidade três (GIII) demonstram citoplasma degenerado e apenas uma e/ou camada incompleta de células do *cumulus* expandida. Oócitos de qualidade quatro (GIV) ou desnudos apresentam degeneração nuclear e ausência de células do *cumulus*.

Ademais às características qualitativas avaliadas após a recuperação oocitária citadas anteriormente, para que a célula alcance a maturação e se torne apta para os processos que sucedem a MIV na PIVE, para a capacitação gradual do oócito, uma série de eventos nuclear e citoplasmáticos devem ocorrer (Cajas et al., 2020), correspondendo à aquisição de funções celulares críticas para todo o funcionamento e desenvolvimento subsequente da progressão embrionária.

Para que a maturação oocitária tenha êxito *in vitro*, diferentes condições de cultivo e protocolos foram desenvolvidos visando mimetizar as mesmas condições fornecidas às células que maturaram *in vivo*. O meio mais empregado entre os laboratórios de produção *in vitro* é o *Tissue Culture Medium* 199 (TCM199), suplementado com fontes de energia (como piruvato, glutamina e glicose), aporte proteico (como o soro fetal bovino e albumina sérica bovina), hormônios gonadotróficos, como hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH), e estradiol (E<sub>2</sub>) (Chaves et al., 2010), além de fatores de crescimento (EGF e IGF1) (Yang et al., 2022), antibióticos e antioxidantes (Sovernigo et al., 2017). Ademais às condições proporcionadas pelos meios de cultivo, as exigências para maturação de oócitos bovinos necessitam ser realizadas na temperatura de 38 – 39 °C por 20 – 24 h, em estufa com atmosfera controlada de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e umidade máxima (Ferré et al., 2020).

### **2.1.1. Maturação oocitária**

O ambiente folicular é responsável tanto pela manutenção da parada meiótica do oócito na prófase I (estágio de vesícula germinativa), quanto pela retomada da meiose. Este bloqueio ocorre ainda na vida fetal por meio de junções tipo GAP entre as células da granulosa e as células do *cumulus* que o circundam os oócitos, permitindo troca direta de nucleotídeos cíclicos, como o monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) e monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), essenciais para o bloqueio da meiose em fase de diplóteno da prófase I e a retomada dessa progressão meiótica após a dissociação dessas células (Gilchrist et al., 2016). A dissociação entre o COC's e a parede folicular durante processo de aspiração folicular do oócito promove a retomada da meiose de forma dependente, até estágio de metáfase da segunda divisão meiótica (metáfase II), expulsando o primeiro corpúsculo polar e promovendo maturação nuclear completa (Mao et al., 2013).

Entretanto, apenas a condensação e divisão dos cromossomos durante a maturação nuclear do oócito não são suficientes, é fundamental que a mesma ocorra simultaneamente à reorganização de organelas, armazenamento de proteínas e produção de fatores de transcrição, eventos que acontecem na maturação citoplasmática, para assim, proporcionar a competência oocitária necessária para a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial subsequente (Li e Albertini, 2013).

A reestruturação das organelas no citoplasma do oócito durante a maturação é desempenhada por meio dos microfilamentos e microtúbulos do citoesqueleto, essas alterações se iniciam desde o recrutamento do oócito até a maturação citoplasmática completa, tornando a competência oocitária inteiramente dependente do funcionamento e coordenação de todos os elementos atuantes nesse processo (Ferreira et al., 2009). Para adquirir essa competência, uma série de mecanismos celulares ocorrem no citoplasma, como a transcrição de RNAm e tradução de proteínas que atuam após a fertilização, dando suporte e regulando o desenvolvimento embrionário inicial (Krisner, 2004).

Além disto, as alterações ultraestruturais que intercorrem nas organelas são fundamentais, de forma, que as mitocôndrias são realocadas para as zonas de maior consumo energético, sendo as principais encarregadas do fornecimento de energia consumida pelo oócito durante o processo de maturação e essencial para o embrião durante os períodos críticos de clivagem (Stojkovic et al., 2001). Os ribossomos são armazenados para induzir diretamente à síntese de proteínas durante períodos cruciais do desenvolvimento, como as fases de crescimento oocitário e ativação do genoma embrionário após a fertilização (Hyttel et al., 2001).

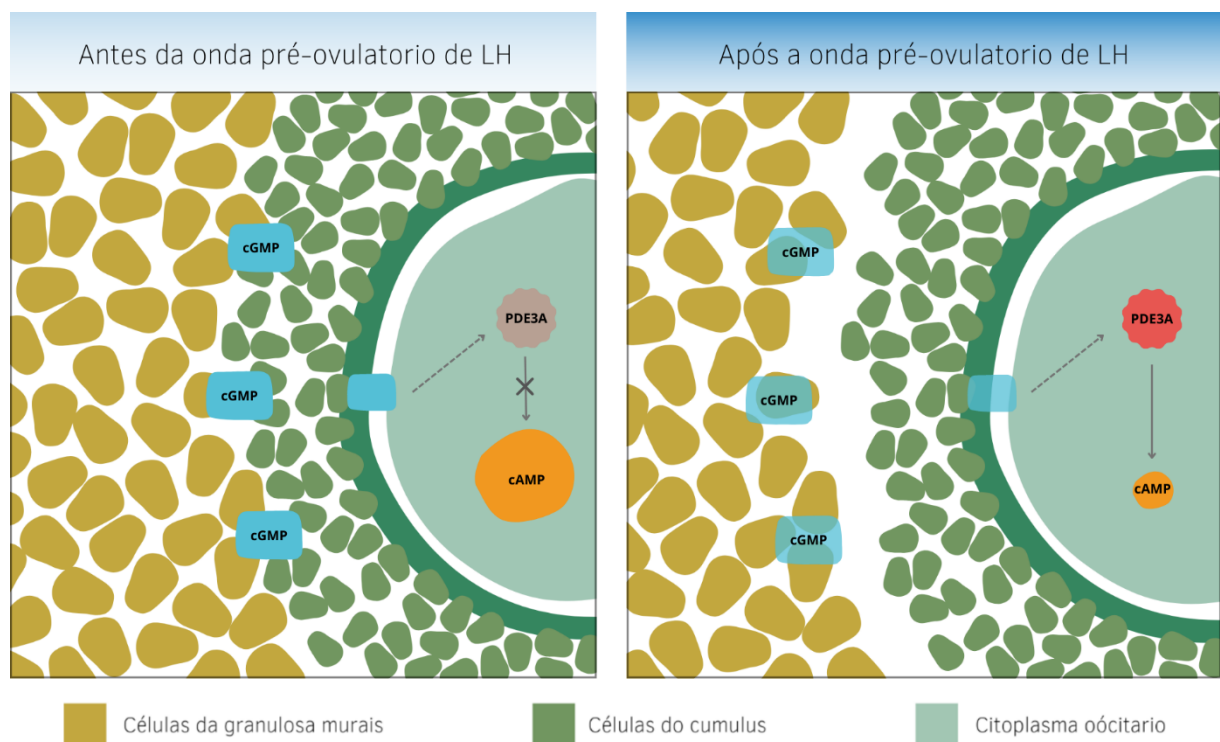
O retículo endoplasmático se aloca distribuído uniformemente no citoplasma do oócito auxiliando o funcionamento adequado da regulação do cálcio intracelular, desempenhando papel importante na sinalização, de forma que, a entrada do espermatozoide no oócito libere cálcio do retículo para desenvolvimento correto da fertilização (Kline, 2000). Levando em consideração a ação do retículo endoplasmático, os grânulos corticais atuam auxiliando esse mecanismo, onde antes da maturação se encontram dispersos no citoplasma e após ela, distribuem-se uniformemente na periferia da membrana plasmática, organizado para sinalizar a entrada do espermatozoide em qualquer local da célula, desencadeando a liberação de cálcio do retículo endoplasmático e ativando o Complexo de Golgi para modificar os receptores espermáticos da zona pelúcida (Hosoe e Shioya, 1997).

### ***2.1.2. Mecanismo de ação do cAMP***

O mecanismo de bloqueio meiótico ocorre particularmente, em virtude do cAMP que é produzido pelas células somáticas foliculares, incluindo células da teca, células da granulosa mural e células do cumulus e consecutivamente são transferidos para o oócito, mantendo os

níveis elevados e bloqueando o fator promotor da meiose (FPM). Para que esse mecanismo ocorra, as células da granulosa murais produzem fatores que interrompem a progressão da meiose oocitária como o inibidor da maturação oocitária (OMI), estimulando a produção e propagação do cGMP nas células do *cumulus* para o oócito através de junções comunicantes do tipo *GAP*. Com a passagem desse nucleotídeo, a molécula responsável pela degradação do cAMP específica do oócito é inativada (fosfodiesterase 3A - PDE3A), promovendo a elevação dos níveis basais de cAMP, acarretando na parada meiótica (Medina-Chávez et al., 2021).

Entretanto, após o aumento da onda de hormônio luteinizante (LH) a comunicação entre o COC's e as células da granulosa é interrompida, acarretando diretamente na diminuição nos níveis de cGMP intraoocitário. Com isso, a PDE3A é acionada promovendo a degradação seletiva das moléculas de cAMP, ativando consequentemente o (FPM) para retomada bem-sucedida da progressão meiótica do oócito (Figura 15) (Pan e Li, 2019).



**Figura 15.** Mecanismo de ação do cGMP sobre a regulação dos níveis de cAMP intracitoplasmáticos no oócito antes do processo de retoma da meiose. Arquivo pessoal adaptado de Pan e Li (2019).

### 2.1.3. Pré-Maturação *In Vitro* e o uso de moduladores

A ação da PDE3A nos níveis intracitoplasmáticos de cAMP no oócito, durante a retomada da meiose *in vivo*, ocorre de forma gradual para que o processo de maturação nuclear e citoplasmática durante a maturação final do oócito seja concluído adequadamente, antes da ovulação em algumas espécies (Gilchrist et al., 2016). Na recuperação dos COC's imaturos para PIVE os níveis de cAMP diminuem subitamente quando comparado ao sistema fisiológico, levando em consideração a forma com que a comunicação entre as células da granulosa e as células do *cumulus* é interrompida, inibindo a ação do cGMP sob a PDE3A, promovendo a perda da atividade inibitória sobre o cAMP, que resulta na maturação oocitária “forçada” (Richani et al., 2014).

Diante disso, estudos realizados promovendo a regulação artificial da retomada meiótica por moduladores que regulam o cAMP durante as primeiras 2 horas após a coleta do oócito, auxiliam na progressão meiótica e maturidade citoplasmática da célula (Appeltant et al., 2015; Ezoe et al., 2015; Zeng et al., 2014). Essa modulação e regulação nos níveis de cAMP são obtidos a partir da etapa de pré-maturação *in vitro* por meio do uso de ativadores da adenilato ciclase ou inibidores inespecífico da fosfodiesterase, como o dibutilil de cAMP (dbcAMP) e 1-isobutil 3-metilxantina (IBMX) respectivamente, auxiliando no aumento dos níveis de cAMP e retomada gradual da meiose, contribuindo com o desenvolvimento da competência oocitária (Wu et al., 2020).

### **2.1.3.1 IBMX**

A 3-isobutil 1-metilxantina, comercialmente chamada de IBMX, é um inibidor de enzimas fosfodiesterases (PDE) de nucleotídeo cíclico não específico, que tem como uma de suas funções ser utilizado para bloqueio temporário da retomada espontânea da meiose em oócitos no processo de PIVE (Gupta et al., 2020). Essa inibição momentânea da retomada da meiose se tornou um método que permite aos oócitos a execução adequada da maturação que são fundamentais para o alcance da competência nuclear e citoplasmática, durante a fase de pré-maturação *in vitro* (Ambrogi, 2016).

As ações inibitórias reversíveis do IBMX isolado ou em combinação com outras substâncias (peptídeo natriurético tipo C, forskolina, heparina, entre outros) auxiliam na comunicação das células entre as células do COC's e melhora a qualidade dos blastocistos em bovinos, impede

a queda abrupta na concentração de cAMP em equinos e promove melhora na maturação oocitária em camundongos (Soto-heras et al., 2019; Tscharke et al., 2020; Abdel-Ghani et al., 2018; Razza et al., 2018; Zeng et al., 2013).

### **2.1.3.2 dbcAMP**

O dibutilil de cAMP (dbcAMP) é uma molécula ativadora permeável à membrana celular semelhante ao cAMP endógeno com ação direta ao ser incubado *in vitro* em uma variedade de células (Blecher et al., 1970).

Além da virtude da capacidade de transporte transmembrana, essa molécula também é frequentemente eficaz em muitos desses sistemas nos quais o nucleotídeo parental tem pouca ou nenhuma atividade e maior resistência à hidrólise pela PDE3A, o dbcAMP é mais eficaz na manutenção da parada meiótica do oócito e no aumento da competência meiótica. Entretanto, o efeito específico do dbcAMP em meios indefinidos ainda não é certo, sendo importante realizar mais estudos em meio quimicamente definido (Ramos Leal et al., 2018).

## **2.2. Fertilização In Vitro**

O processo de fertilização *in vitro* requer a maturação bem sucedida dos oócitos na sua competência nuclear e citoplasmática, a capacitação espermática para que as células se tornem aptas para a fecundação dos oócitos e a composição dos meios utilizados no procedimento da FIV (Paramio e Izquierdo, 2016).

A capacitação espermática é um processo que ocorre durante o percurso no trato reprodutivo da fêmea (*in vivo*), removendo da célula, os componentes decapacitantes, sem modificar a morfologia, mas sim, a composição bioquímica, sendo um mecanismo indispensável para que ocorra a reação acrossômica e a penetração do espermatozoide no oócito (Parrish, 2014). Na FIV, para que a seleção dos espermatozoides seja adequada, é de suma importância utilizar métodos qualificados, a fim de proporcionar uma seleção normal, baseando-se nos princípios naturais de capacitação espermática, sendo utilizado de forma similar ao que ocorre *in vivo* para obtenção de êxito na técnica (Gadella e Luna, 2014).

Para a capacitação espermática na FIV da espécie bovina, utiliza-se, sobretudo, de sêmen congelado preconizando a separação dos espermatozoides viáveis do plasma seminal e do diluente (extensores e crioprotetores), sendo as técnicas mais empregadas a de *swim-up* ou o gradiente de densidade (Parrish et al., 1995). No método *swim-up* o sêmen é depositado no fundo de um tubo cônico, em meio propício, para auxiliar os espermatozoides viáveis a se moverem em direção ascendente durante incubação média de 1 hora em estufa (Rubessa et al., 2020).

Diferentemente, o gradiente de densidade (Percoll®, PureSperm®, Ficoll®, entre outros) ocorre por centrifugação do sêmen depositado na parte superior do gradiente composto de sílica coloidal, para que as células viáveis se desloquem através dos diferentes gradientes, separando os espermatozoides vivos dos demais constituintes do sêmen (Supúlveda et al., 2017).

Após a separação dos espermatozoides, objetiva-se promover ambiente adequado para que a fecundação ocorra, garantindo o metabolismo apropriado dos COC's, assim como manter a função espermática eficiente. Para o co-cultivo dessas células é adotado o uso de meio FIV, composto por *Tiroide-albumina-lactato-piruvato* (TALP) e acrescido de substâncias que favorecem os espermatozoides, como hipotaurina, epinefrina, heparina e gentamicina, durante o período de 18 a 22 horas, na temperatura de 38 – 39 °C e umidade máxima em estufa de atmosfera controlada com 5% de CO<sub>2</sub> (Gonçalves et al., 2021).

### **2.3. Cultivo In Vitro**

Desde a formação do zigoto até o estágio de blastocisto durante a etapa do cultivo *in vitro*, múltiplos eventos importantes do desenvolvimento embrionário devem ocorrer para obter-se embriões com êxito. Observamos esses eventos como a primeira divisão do núcleo obtendo um embrião clivado com duas células, que ocorre por volta do 1º dia do cultivo, a ativação do genoma embrionário no embrião de 8 a 16 células sucedendo em torno do 3º dia do cultivo, o estágio de mórula e sua compactação intercorrendo em média no 5º dia do cultivo, e por fim, a formação do blastocisto no 7º dia do cultivo, compreendendo a diferenciação dos blastômeros na trofocotoderma e na massa celular interna (Lonergan et al., 2003).

Após a FIV, os prováveis zigotos são selecionados do meio de fertilização e postos em meio de cultura que favorece o desenvolvimento dos embriões até um estágio compatível com seu regresso ao útero *in vivo*. Diversos meios são utilizados para o cultivo dessas células, entretanto, o meio SOF (Fluido Sintético de Oviduto), que mimetiza à composição do fluido do oviduto ainda é o mais utilizado, acrescido de aminoácidos essenciais e não essenciais, antibióticos, vitaminas e antioxidantes (Ferré et al., 2020). Diferentemente das etapas prévias, quando possível é preferível que o cultivo seja realizado em estufa de bancada, permitindo fazer o uso da mistura de gases (5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> e 90% de N<sub>2</sub>), com *layout* de divisórias que auxiliam na restauração e manutenção da temperatura (38 - 39 °C), pH e fluxo de gases (Kelly e Cho, 2014).

#### 2.4. **RT-PCR em células embrionárias**

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular que consiste na amplificação de uma sequência de nucleotídeos específica de moléculas de DNA ou RNA, produzindo milhões de cópias da amostra alvo possibilitando a avaliação daquela molécula para diversos fins, como a diagnóstico de doenças genéticas ou infecciosas e testes genéticos (Melo et al., 2012).

Para esse processo, primeiramente é realizada a desnaturação da amostra de DNA para que a molécula se torne uma fita única. Após isso, dá-se início ao processo de anelamento, determinado por meio de *primers* (fragmentos de DNA de fita simples com uma média de 20 nucleotídeos de comprimento), o espaço a ser copiado ou amplificado da molécula de DNA de forma que eles se ligam à região de interesse por pareamento de bases complementares. Assim que as bases são pareadas, ocorre a etapa de extensão por meio da enzima *Taq* polimerase, que prolonga os *primers* sintetizando uma nova molécula de DNA, gerando dessa forma inúmeras cópias do fragmento que expressa o gene de interesse (Erlich, 1989).

No caso da PCR em tempo real (RT-PCR), é possível avaliar a quantidade expressiva de gene específico presente na amostra de DNA analisada durante o processo de síntese por meio do monitoramento da fluorescência de corantes inseridos na reação, expressando a quantidade de produto formado, assim como o número de ciclos de amplificação que foram necessários para obter a quantidade específica de moléculas de DNA registrada (Garibyan e Avashia, 2013).

Em vista disso, por meio da técnica de RT-PCR, é possível avaliar os efeitos da PIV na atividade genômica de células embrionárias, revelando de forma quantitativa a presença ou ausência de genes importantes para o desenvolvimento inicial e suas fases consecutivas, podendo ser alterados de acordo com o protocolo, meios de cultivo e adição ou não de moduladores durante o processo de PIV de embriões (Niemann e Wrenzycki, 2000).

### **3. METODOLOGIA**

#### ***3.1. Coleta de oócitos, pré-maturação in vitro e maturação in vitro (MIV)***

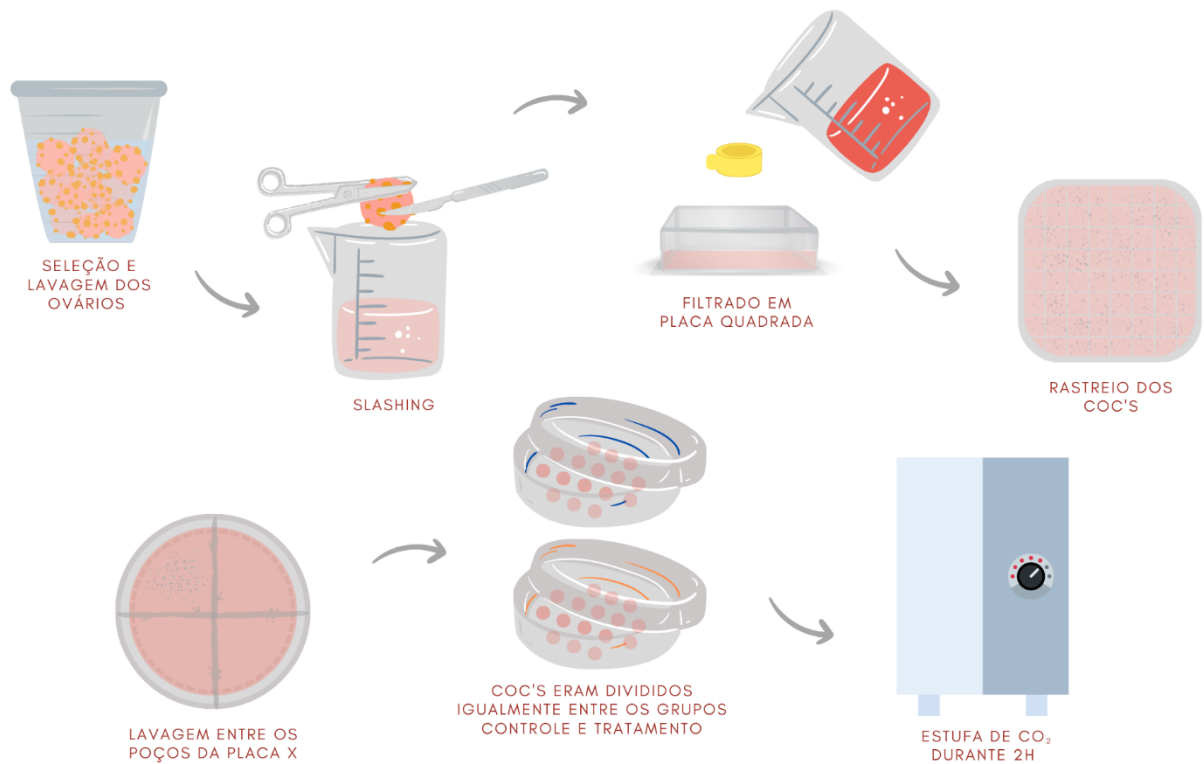
Ovários oriundos de animais adultos da espécie bovina foram obtidos em abatedouro comercial e transportados ao laboratório em potes plásticos contendo aproximadamente 500 mL de solução salina (0,9% NaCl), à temperatura variando entre 25-30 °C, contendo *Pen/Strep*. Os ovários foram separados, classificados e selecionados, aqueles que apresentavam grande número de folículos pequenos (<5 mm de diâmetro) e médios (5–10 mm), evitando folículos grandes (>10mm de diâmetro) (Figura 16), para em seguida, realizar a lavagem com solução salina (38,5 °C), massageando dentro do recipiente de plástico, para retirar vestígios de sangue dos ovários. Após a lavagem, os ovários eram reservados em recipiente contendo solução salina, e mantidos sob placa aquecedora (38,5 °C) até o momento da coleta dos oócitos.

O processo de recuperação oocitária foi realizado por meio de *slashing*, que consiste em realizar incisões de 2 a 3 mm, utilizando lâmina de bisturi 11, nos folículos visíveis do ovário fixado em pinça hemostática, em béquer estéril de 500 mL contendo 100 mL de meio de coleta de oócitos (MOFA/BovinePlus com BSA - Minitube), aquecido à 38,5 °C. Submergia-se o ovário em MOFA, agitando-o e pressionando-o na parede do béquer, retraindo os COC's no meio até que todos os ovários fossem coletados (Figura 17).



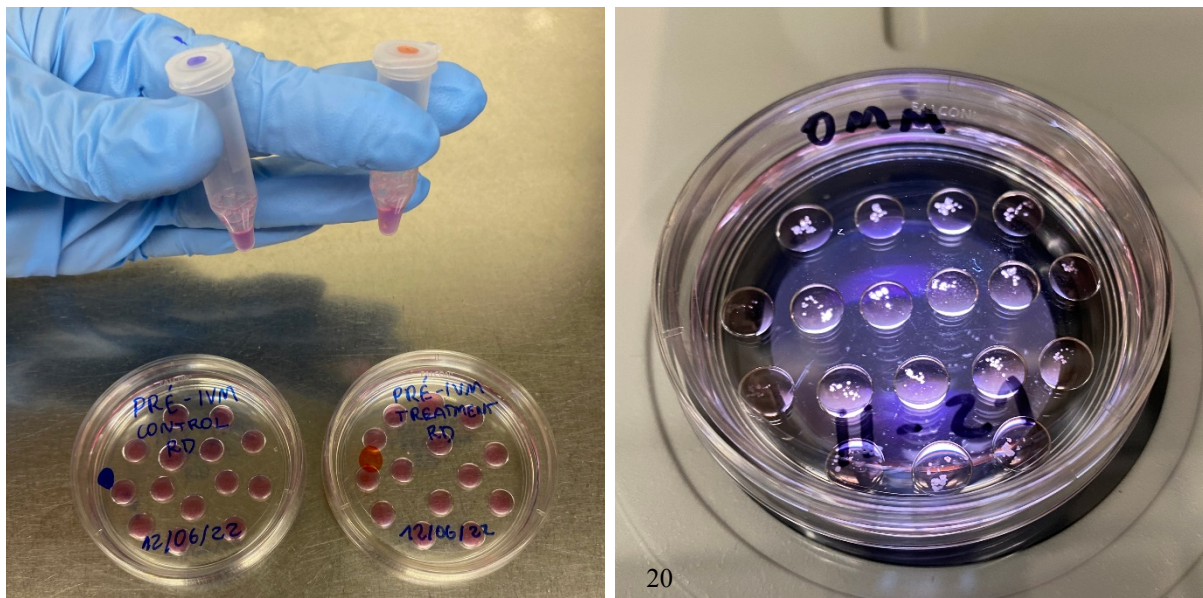
**Figura 16.** Processo de separação, classificação e seleção dos ovários bovinos para *slashing*. **Figura 17.** *Slashing* dos ovários com mais de 15 folículos entre 5-10 mm. Fonte: Autora (2023).

O meio recuperado foi filtrado utilizando filtro de células de 100  $\mu\text{m}$ , despejando em placa de Petri quadrada e gradeada, lavando o filtro na parte inferior utilizando seringa de 10 mL acoplada à agulha 18G e preenchida com MOFA. Sob um estereomicroscópio, COC's com citoplasma homogêneo e ao menos três camadas de células *cumulus* compactas foram recuperados, transferidos para placa de poço em X contendo MOFA e lavados entre os poços para retirada de detritos celulares. Em seguida, transferidos para placa de pré-maturação contendo gotas de 50  $\mu\text{L}$  de meio de pré-maturação (TCM199/Bicarbonato; Gibco, Life Technologies), suplementado com glutamina, piruvato de sódio, *Pen/Strep* e SFB em placas de petri (60 mm) imersas em óleo para cultivo celular (Fujifilm) (Figura 18). A pré-maturação foi dividida em dois grupos, o controle (sem adição de moduladores de cAMP) e o tratamento (adicionados ao meio de pré-maturação 22  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de IBMX e 49  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de dbcAMP) (Figura 19) que foram incubados por 2 horas a 38,5  $^{\circ}\text{C}$  com 5% de  $\text{CO}_2$  e umidade máxima.



**Figura 18.** Desenho experimental do processo de *slashing*, filtração, recuperação oocitária e pré-maturação *in vitro*. Fonte: Autora (2023).

Após o período de incubação, os COC's foram lavados em gotas de 50  $\mu\text{L}$  de meio de maturação oocitária (OMM) e transferidos para placa de petri (60 mm) cada grupo contendo gotas de 50  $\mu\text{L}$  de OMM (TCM199/Bicarbonato; Gibco, Life Technologies), suplementado com FSH e EGF, glutamina, piruvato de sódio, *Pen/Strep* e SFB, imersas em óleo para cultivo celular (Fujifilm) e submetidos à incubação por 20 horas à 38,5 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade máxima (Figura 20).



**Figura 19.** Placa de pré-maturação do grupo controle (sem adição de moduladores) e grupo tratamento (com adição de IBMX e dbcAMP). **Figura 20.** Placa de maturação após a pré-maturação dos COC's. Fonte: Autora (2023).

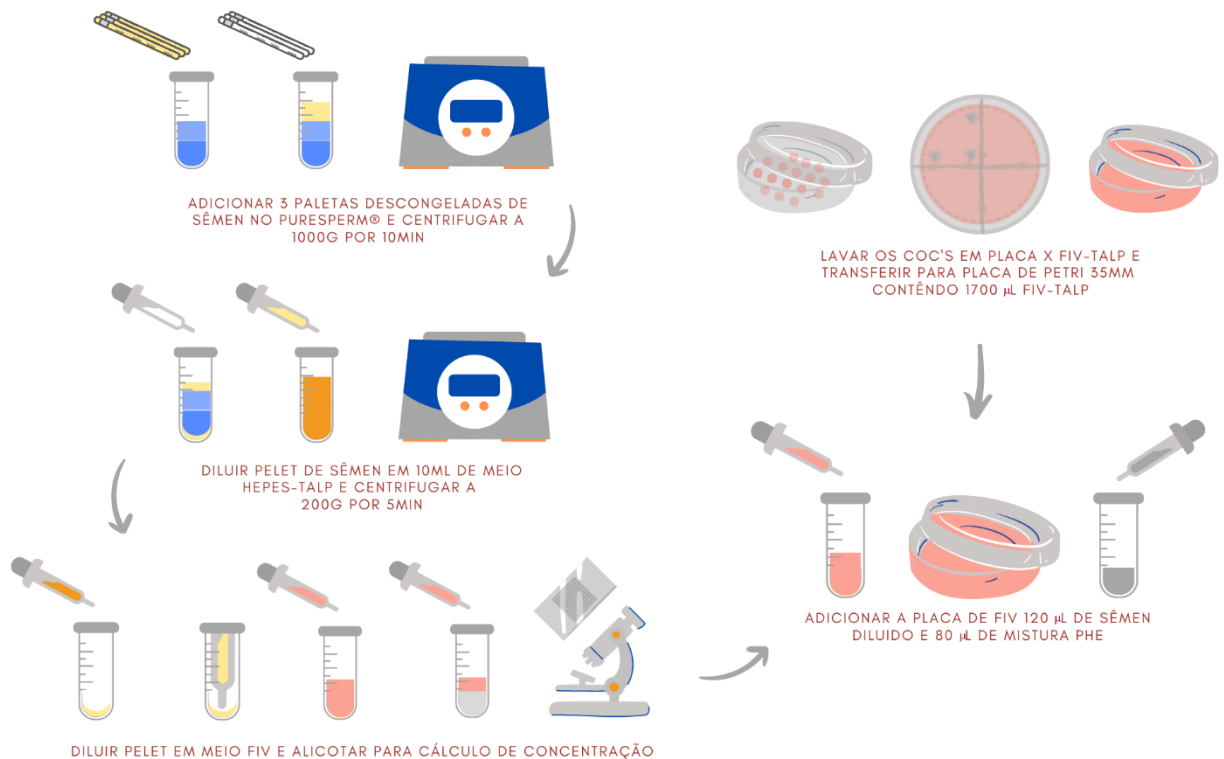
### 3.2. Fertilização *In Vitro* e Cultivo *In Vitro*

Para a etapa de fertilização *in vitro*, foi realizado o processo de capacitação espermática pelo método de gradiente comercial PureSperm® (1,5 mL de 80% PureSperm e 1,5 mL 40% PureSperm de pH entre 7,4 e 7,8 incubado a 38 °C em estufa de atmosfera controlada, 4 horas antes do procedimento), utilizando sêmen congelado proveniente do pool de três diferentes touros, em virtude de aumentar a variação genética e diminuir fatores que venham a interferir na FIV relacionados a individualidade do touro utilizado.

As palhetas foram descongeladas em *Citohaw* por 45–60 segundos a 37 °C e depositadas no topo do gradiente de PureSperm® (tubo cônico de 15 mL), para centrifugação em transportador de centrífuga aquecido, a 1000 g por 10 min. Após a centrifugação, o pellet de sêmen depositado no fundo do tubo cônico era aspirado por pipeta de Pasteur de plástico e depositado em novo tubo cônico de 15 mL contendo 10 mL de HEPES-TALP e centrifugando-se por 5 min a 200 g, em novo transportador de centrífuga aquecido. Em seguida, o sobrenadante era descartado utilizando pipeta de Pasteur sem desorganizar o pellet. Para avaliar volume final do sêmen e determinar a concentração de espermatozoides com auxílio de hemocítmetro, diluía-se para  $17 \times 10^6$  espermatozoides/mL usando FIV-TALP pré-

aquecido e equilibrado concluindo em concentração final de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL na placa de fertilização.

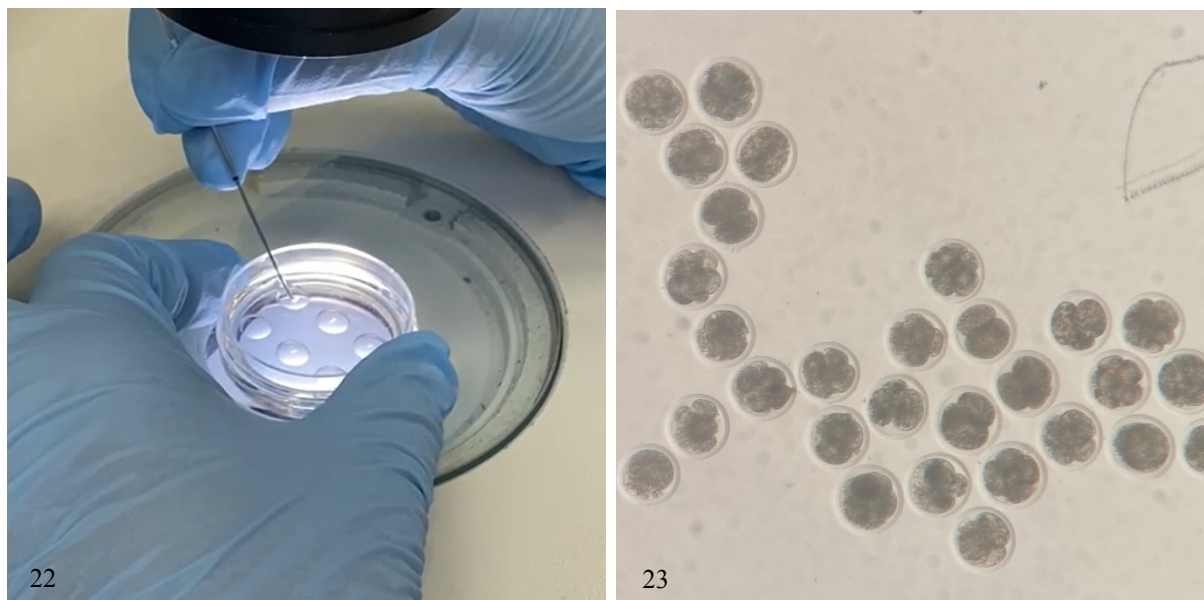
Simultaneamente, os oócitos previamente maturados foram retirados da placa de maturação, depositados e lavados em placa de poços em X contendo meio HEPES-Talp (*tyrode's albumin lactate pyruvate*) e transferidos para placa de petri (35 mm) contendo 1700  $\mu$ L de meio FIV-Talp. Por fim, era adicionada 120  $\mu$ L do sêmen capacitado e 80  $\mu$ L de mistura PHE (penicilina, hipotaurina e epinefrina), associado aos COC's e submetendo-os à incubação por 18 horas à 38,5 °C com 5% de CO<sub>2</sub> e umidade máxima (Figura 21).



**Figura 21.** Desenho experimental do processo de capacitação espermática e fertilização *in vitro*. Fonte: Autora (2023).

Após o termino da incubação, os possíveis zigotos passavam pelo processo de desnudação para retirada das células do *cumulus* pelo método de vórtex em tubo cônico (1,5 mL) em mistura de meio HEPES-Talp (300  $\mu$ L) e hialuronidase (100  $\mu$ L), durante 5 minutos em força máxima. O tubo era lavado com 1 mL de meio HEPES-Talp e o conteúdo transferido para o primeiro poço da placa em X, adicionando 3 mL de meio em cada poço e movendo os possíveis zigotos entre os poços, retirando células do *cumulus* e detritos do meio. Por fim, eram transferidas em grupos de 25–30 células para gotas de 50  $\mu$ L de SOF-BE2,

imersas em óleo para cultivo celular (Fujifilm) e submetidos à incubação em estufa de bancada (Figura 22) com mistura de gases (5,5% de CO<sub>2</sub> e 5% de O<sub>2</sub>) a 38,5 °C e umidade máxima por 6 dias. Em 48 horas de cultivo, foi realizada a avaliação de clivagem celular de forma minimamente invasiva (Figura 23).



**Figura 22.** Placa de cultivo com gotas de 50 µL de meio SOF-BE2. **Figura 23.** Registro de avaliação da taxa de clivagem no 3º dia após fertilização. Fonte: Autora (2023).

### 3.3. RT-PCR

A análise RT-PCR foi realizada nos blastocistos (7,5 dias após a FIV) de cada grupo, lavados em solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco (DPBS), submetidos à remoção de zona pelúcida por solução ácida tiroidiana, combinados em *pools* de 10 células e armazenados a -80 °C. O RNA total foi extraído de cada amostra usando o RNeasy Micro Kit (Qiagen). O DNA genômico foi removido pela digestão recombinante do Kit de Transcrição Reversa de cDNA de Alta Capacidade (Biosystems). O RNA foi quantificado usando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). A análise de PCR em tempo real foi realizada em um instrumento PTC-100 Thermal Cycler (MJ Research) em um volume de reação de 20 µL contendo 1 µL de cDNA, 1 µL cada de *primers* frente e verso (Tabela 1), 8 µL de água livre de nuclease e 10 µL de SYBR Green PC Master Mix (Applied Biosystems). Os testes foram realizados em duplicata. Utilizou-se os parâmetro universais de ciclo térmico (passo inicial de 2 min a 50 °C e 10 min a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 60 s a 60 °C) avaliando a curva de fusão do termociclador em tempo real para verificar a

especificidade da reação. A análise quantitativa final dos genes foi realizada usando a curva padrão para cada gene e os resultados foram comparados de acordo com a expressão para os diferentes grupos.

**Tabela 1.** Detalhamento dos *primers* usados para RT-PCR

Genes	Sequência do Primer (5'-3')*	Temperatura de Anelamento (°C)
<i>SOX2</i>	F-ACAGTTGCAAACGTGCAAAG R-AGACCACGGAGATGGTTTTG	55
<i>GATA4</i>	F-ATCAAAGACACCAGCAGGTCC R-GACATCGCACTGACCGAGAA	57
<i>GAPDH</i>	F-GGCTCTTCACTACCATGGAGAA R-GTTCACGCCCATCACAAACA	56
<i>SOX17</i>	F-CAGAACCCAGATCTGCACAAC R-CAGCGTCAGTGCCTTCCA	58
<i>EOMES</i>	F-GCGGAAAAGCGGACAATAAC R- TCCAGTGGGAACCAGTGTTA	55
<i>NANOG</i>	F-GACACCCTCGACACGGACAC R-CTTGACCGGGACCGTCTCTT	60
<i>YWHAZ</i>	F-GCATCCCACAGACTATTTCC R-GCAAAGACAATGACAGACCA	53

\*Orientação do primer: F – frente; R – verso.

### 3.4. Análise Estatística

Todos os dados foram checados para normalidade. Para todas as análises estatísticas, utilizaram-se os procedimentos GLIMMIX e GLM do SAS (*Statistical Analyses System*). Foram consideradas 5% de probabilidade.

## 8. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este experimento procurou investigar a ação de moduladores dos níveis de cAMP durante a etapa de pré-maturação *in vitro* para auxiliar a aquisição de competência oocitária e consequente melhora no desenvolvimento embrionário inicial. Contudo, a adição de 22 mg/mL de IBMX e 49 mg/mL de dbcAMP em meio TCM199 sem suplementação de gonadotrofinas e fatores de crescimento na pré-maturação meiótica de COC's bovinos no presente estudo, demonstrou não ter efeito ( $P > 0,05$ ) na taxa de clivagem e número de blastocistos, quando comparado ao grupo controle (Tabela 2).

**Tabela 2.** Número de estruturas cultivadas, clivadas, blastocistos produzidos e taxa de clivagem observados em embriões durante cultivo *in vitro* nos grupos controle e tratamento (22 µg/mL de IBMX e 49 µg/mL de dbcAMP).

Grupos	Total de cultivados	Clivados	Blastocistos	Blastocistos/Clivados%
Controle	824	689	258	37,44 <sup>a</sup>
Tratamento	818	658	248	37,68 <sup>a</sup>

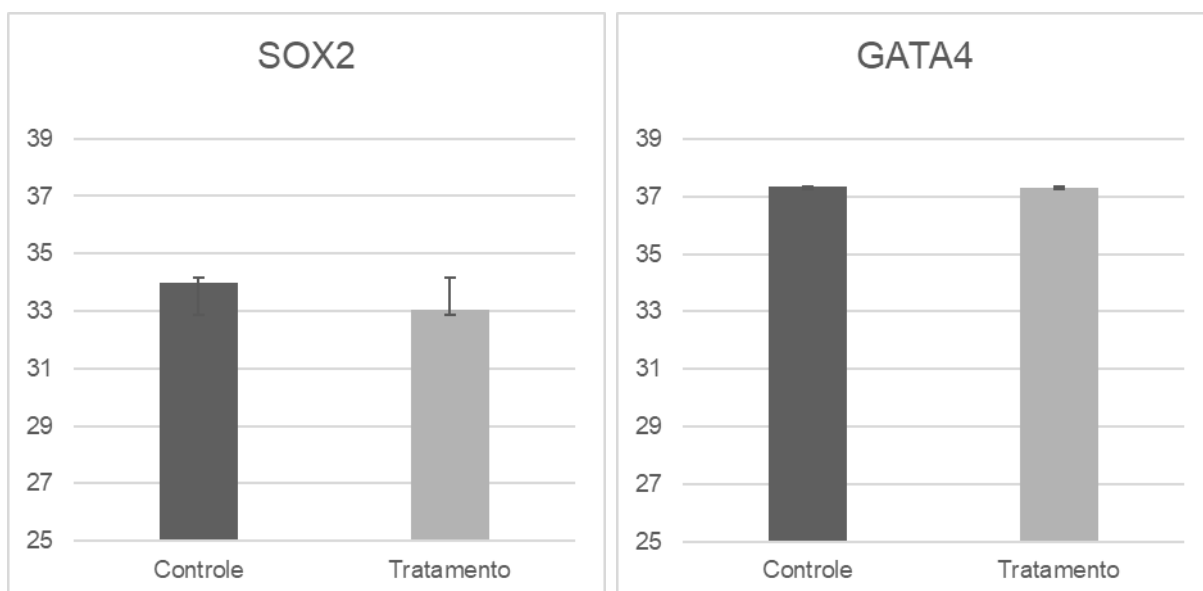
Estudos prévios sobre a etapa de pré-maturação *in vitro* de oócitos mamíferos são controversos. Os resultados provenientes desse experimento estão de acordo com relatos anteriores, em que as taxas de blastocistos não foram afetadas pela presença combinada de IBMX e dbcAMP durante a pré-maturação *in vitro* de oócitos murinos (Wu et al., 2020) ou de forma dissociada adicionando apenas dbcAMP utilizando o modelo suíno (Park et al., 2012; Appeltant et al., 2015).

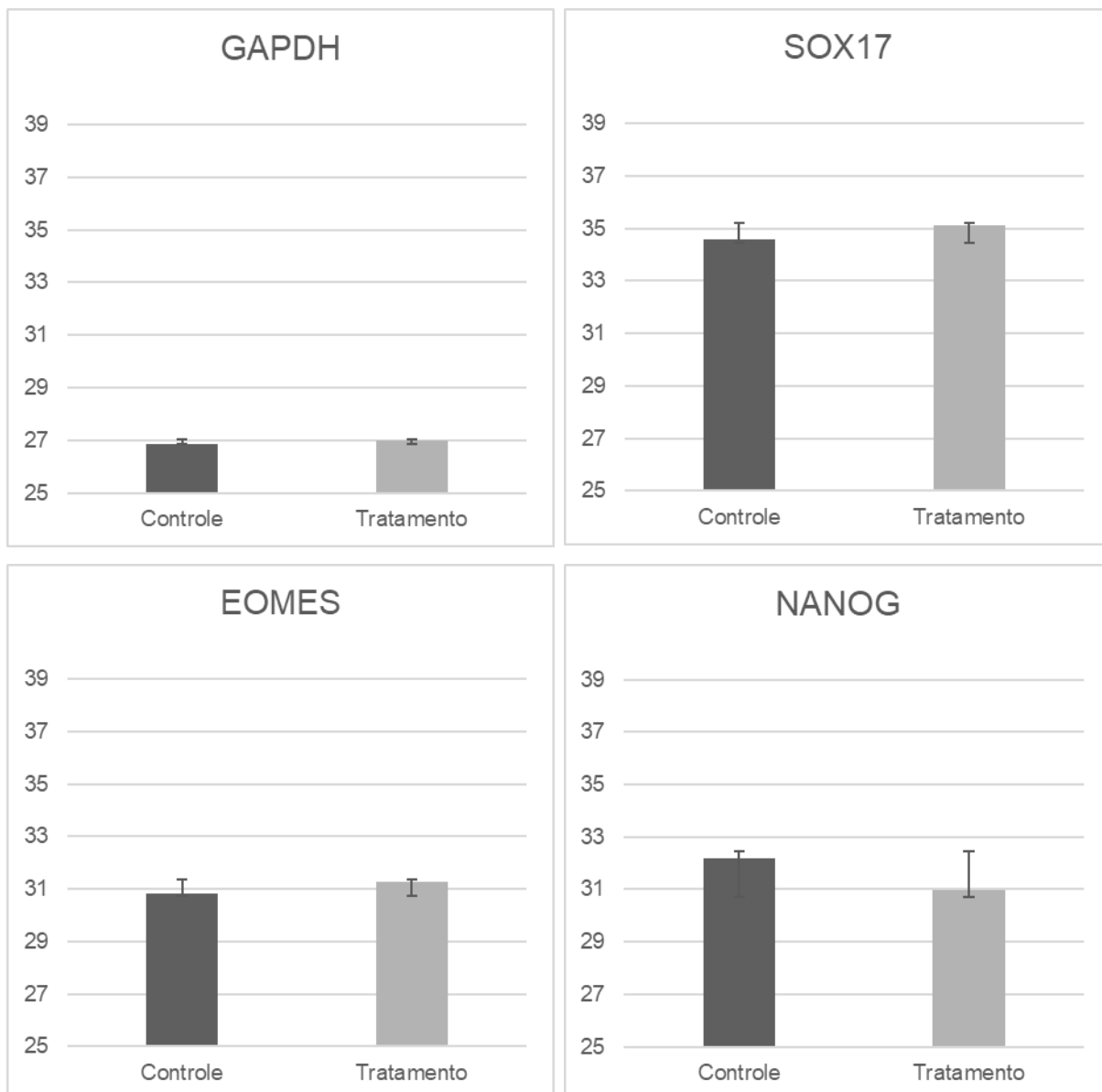
No entanto, Sugimura et al. (2018) relataram que a pré-maturação *in vitro* de oócitos bovinos usando o dbcAMP e o IBMX, apresentou melhores taxas de blastocistos. Porém, a quantidade de possíveis zigotos cultivados demonstra ser baixa quando comparada ao presente estudo e a estudos anteriores, sendo extremamente relevante para a validação das conclusões expressas.

Essas divergências também podem ser explicadas quando comparamos a ação das PDE's entre as espécies. Além da PDE8 expressar maior atividade em comparação com a

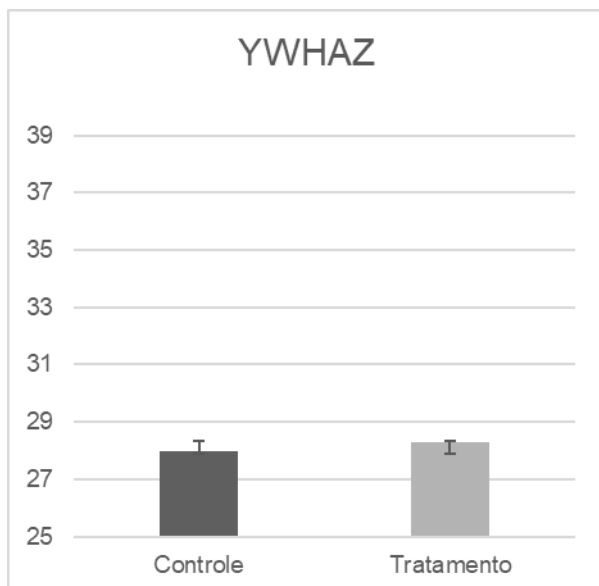
PDE3 em oócitos bovinos, também é a única classe de PDE que não pode ser inibida pelo IBMX, interferindo no mecanismo de degradação do cAMP em comparação com outras espécies (Sasseville et al., 2009). Assim, mesmo com a adição do dbcAMP para aumentar os níveis intracitoplasmáticos de cAMP, o uso de um inibidor não específico de PDE pode ter interferido na manutenção dessa molécula essencial para manter a meiose estacionada durante a pré-maturação. Dessa forma, faz-se necessário investigar a fundo as interações das PDE's análogas ao cAMP e outras moléculas que estão envolvidas na progressão meiótica de oócitos bovinos.

Além disso, procuramos avaliar o efeito e a eficiência da pré-maturação *in vitro* com o uso de moduladores por meio de expressão gênica em blastocistos quanto à expressão de 7 genes de manutenção relacionados à qualidade embrionária, SOX2, GATA4, GAPDH, SOX17, EOMES, NANOG e YWHAZ. Comparando o grupo controle com o grupo tratado, não encontramos diferença dos genes expressos entre os grupos, indicando que o uso de IBMX e dbcAMP não afetou a expressão gênica em blastocistos (Gráfico 1).





**Gráfico 1.** Expressão gênica de blastocistos produzidos oriundos de COC's cultivados em meio de pré-maturação *in vitro* sem (controle) e com (tratamento) adição de moduladores de cAMP (IBMX e dbcAMP). Os dados não apresentam diferença ( $P > 0,05$ ) para todos os genes de manutenção entre os grupos. Os resultados estão expressos em média  $\pm$ DP.



O embrião no estágio de blastocisto, apresenta dois tipos de células morfologicamente diferentes divididas em trofotoderma (TE) na região mais externa, que se desenvolverá para formação da placenta e a massa celular interna (MCI) na região mais interna, posteriormente se diferenciando em duas camadas distintas, o epiblasto e o hipoblasto que formam os folhetos embrionários (Oliveira, 2012).

Dito isso, os genes expressos em ambos os grupos conferem uma série de fatores importantes para a diferenciação e desenvolvimento subsequente dos embriões. O SOX2, SOX17, NANOG e GATA4 quando expressos, apresentam células com melhor diferenciação da MCI na espécie bovina e quando ausentes demonstram número total de células reduzidas que se associa à qualidade embrionária reduzida, consequência do desenvolvimento falho de células epiblasticas (Aguila et al., 2022; Simmet et al., 2022; Kujik et al., 2008). Assim como a expressão do EOMES, que é relatada exclusivamente na TE durante o período de pré-implantação embrionário, sendo necessário para a diferenciação adequada da mesma em células-tronco trofoblásticas e que também terá atuação nas divisões subsequentes (Probst e Arnold, 2017).

Por fim, o GAPDH e o YWHAZ são utilizados como genes de referência para validação e comparação dos genes nos resultados obtidos pela RT-PCR de embriões em desenvolvimento inicial previamente estabelecidos, além de estarem ligados ao metabolismo energético celular (Goossens et al., 2005; Kujik et al., 2007).

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados observados no presente estudo, nos permite constatar que o uso de IBMX e do dbcAMP nas concentrações adicionados ao meio de pré-maturação *in vitro* e no tempo utilizado para essa etapa, não expressa efeito positivo nas taxas de clivagem e blastocistos comparado com o protocolo e composição dos meios previamente estabelecidos, assim como na expressão de genes de manutenção para avaliação de qualidade embrionária em embriões bovinos. Porém, o aprimoramento da etapa de pré-maturação *in vitro* utilizando modelos e quantidades diferentes de moduladores se apresentam promissores em outras espécies, podendo ser utilizada como alternativa para melhoria na qualidade e quantidade de embriões oriundos da PIVE.

Contudo, toda a experiência vivenciada durante o ESO foi extremamente enriquecedora, promovendo conhecimento em diversas áreas da pesquisa em ciência animal, oportunidade de práticas de estudo e pesquisa na área biomolecular, assim como no discernimento de diferentes protocolos que podem ser utilizados na técnica de produção *in vitro* de embriões na espécie bovina.

## 11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-GHANI, M.A. et al. Effects of pre-maturational culture duration on developmental competence of bovine small-sized oocytes. **Journal of Reproduction and Development**, v. 64(4), p. 365–369. 2018.

AGUILA, L. et al. Pluripotent Core in Bovine Embryos: A Review. **Animals**, v. 12(8), p. 1010. 2022.

AMBROGI, M. **Suplementação do meio de transporte com antioxidantes e moduladores de AMP cíclico como estratégia para melhorar a qualidade de oócitos bovinos destinados à produção *in vitro* de embriões**. Jaboticabal, 2016. 103p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016.

APPELTANT, R., et al. Increasing the cAMP concentration during *in vitro* maturation of pig oocytes improves *cumulus* maturation and subsequent fertilization *in vitro*. **Theriogenology**, v. 83(3), p. 344–352. 2015.

APPELTANT, R. et al. Porcine oocyte maturation *in vitro*: role of cAMP and oocyte-secreted factors – A practical approach. **Journal of Reproduction and Development**, v. 62(5), p. 439–449. 2016.

BERNAL, S.M. et al. Effects of different oocyte retrieval and *in vitro* maturation systems on bovine embryo development and quality. **Zygote**, v. 23, p. 367–377. 2015.

BLECHER, M. et al. Metabolism of Dibutyryl Cyclic Adenosine 3', 5'-Monophosphate during Its Regulation of Lipolysis and Glucose Oxidation in Isolated Rat Epididymal Adipocytes. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 245(8), p. 1867-1870. 1970.

CAJAS, Y.N. et al. Antioxidant Nobiletin Enhances Oocyte Maturation and Subsequent Embryo Development and Quality. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21(15), p. 5340. 2020.

CHAVES, R. et al. Sistemas de cultivo *in vitro* para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, p. 37–49. 2010.

ERLICH, H.A. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Immunology**, v. 9(6), p. 437–447. 1989.

EZOE, K., et al. Developmental competence of vitrified-warmed bovine oocytes at the germinal-vesicle stage is improved by cyclic adenosine monophosphate modulators during *in vitro* maturation. **PLOS ONE**, v. 10(5), e0126801. 2015.

FERRÉ, L.B. et al. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, p. 1–14. 2020.

FERRÉ, L.B. et al. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval in cattle: State-of-the-art and its impact on the *in vitro* fertilization embryo production outcome. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 58, p. 363–378. 2022.

FERREIRA, E.M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71(5), p. 836–848. 2009.

GADELLA, B.M., & LUNA, C. Cell biology and functional dynamics of the mammalian sperm surface. **Theriogenology**, v. 81(1), p. 74–84. 2014.

GARIBYAN, L. & AVASHIA, N. Polymerase Chain Reaction. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133(3), p. 1–4. 2013.

GILCHRIST, R.B. Oocyte maturation and quality: role of cyclic nucleotides. **Reproduction**, v. 152(5), p. R143–R157. 2016.

GONÇALVES, P. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal e à humana**. 3. ed. Rio de Janeiro: Roca. 2021. 254 p.

GOOSSENS K, et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. **BMC Developmental Biology**, v.5(27). 2005.

- GUPTA, A. et al. Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: possible therapeutic drugs for female fertility regulation. **European Journal of Pharmacology**, v. 883. 2020.
- HOSOE, M. e SHIOYA, Y. Distribution of cortical granules in bovine oocytes classified by *cumulus* complex. **Zygote**, v. 5, p. 371–376. 1997.
- HYTTEL, P. et al. Ribosomal RNA gene expression and chromosome aberrations in bovine oocytes and preimplantation embryos. **Reproduction**, v. 122, p. 21–30. 2001.
- KELLY, E., & CHO, T. Incubators old and new. **Culture Media, Solutions, and Systems in Human ART**, p. 258–269. 2014.
- KLINE, D. Attributes and dynamics of the endoplasmic reticulum in mammalian eggs. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 50, p. 125–154. 2000.
- KRISHER, R.L. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v. 82 p. 14-23. 2004.
- KUIJK, E.W. et al. Validation of reference genes for quantitative RT-PCR studies in porcine oocytes and preimplantation embryos. **BMC Developmental Biology**, v.7(58). 2007.
- KUIJK, E.W. et al. Differences in early lineage segregation between mammals. **Developmental Dynamics**, v. 237(4), p. 918–927. 2008.
- LI, R., & ALBERTINI, D.F. The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 14(3), p. 141–152. 2013.
- LEIBFRIED, L. e FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v. 48(1), p. 76–86. 1979.
- LONERGAN, P. et al. Oocyte and embryo quality: effect of origin, culture conditions and gene expression patterns. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 38(4), p. 259–267. 2003.
- LONERGAN, P., e FAIR, T. Maturation of Oocytes *in Vitro*. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4(1), p. 255–268. 2016.

- MAO, G. et al. Gap junction -mediated cAMP movement between oocytes and somatic cells. **Frontiers in Bioscience**, v. 5(2), p. 755–767. 2013.
- MEDINA-CHÁVEZ, D.A. et al. cAMP Modulators before *In Vitro* Maturation Decrease DNA Damage and Boost Developmental Potential of Sheep Oocytes. **Animals (Basel)**, v. 11(9), p. 2512. 2021.
- MELO, A.N. et al. Aplicações da técnica de PCR na reprodução animal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 36(2), p. 105-112. 2012.
- MOORE, S.G. & HASLER, J.F. A 100-Year Review: Reproductive technologies in dairy science. **Journal of Dairy Science**, v. 100(12), p. 10314–10331. 2017.
- NIEMANN, H. & WRENZYCKI, C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: Implications for subsequent development. **Theriogenology**, v. 53(1), p. 21–34. 2000.
- OLIVEIRA, D.F. **Análise comparativa da ultraestrutura do hipoblasto em embriões bovinos (*Bos indicus*) derivados de fertilização *in vitro*, transferência nuclear de células somáticas e partenogênese**. São Paulo, 2012. 70p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. São Paulo, 2012
- PAN, B., & LI, J. The art of oocyte meiotic arrest regulation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 17(1), p. 1–12. 2019.
- PARAMIO, M. e IZQUIERDO, D. Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. **Theriogenology**, v. 86(1), p. 152–159. 2016.
- PARK, S.-H. & YU, I.-J. Effect of dibutyryl cyclic adenosine monophosphate on reactive oxygen species and glutathione of porcine oocytes, apoptosis of *cumulus* cells, and embryonic development. **Zygote**, 21(03), 305–313. 2012.
- PARRISH, J.J. et al. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44(6), p. 859–869. 1995.

- PARRISH, J.J. Bovine *in vitro* fertilization: *In vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. **Theriogenology**, v. 81(1), p. 67–73. 2014.
- PROBST, S. & ARNOLD, S.J. Eomesodermin—At Dawn of Cell Fate Decisions During Early Embryogenesis. **T-Box Genes in Development**, v. 122, p. 93–115. 2017.
- RAMOS LEAL, G., et al. Role of cAMP modulator supplementations during oocyte *in vitro* maturation in domestic animals. **Animal Reproduction Science**. (2018).
- RAZZA, E.M. et al. Treatment with cyclic adenosine monophosphate modulators prior to *in vitro* maturation alters the lipid composition and transcript profile of bovine *cumulus* oocyte complexes and blastocysts. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 30(10), p. 1314–1328. 2018.
- ROELEN, B.A.J. Bovine oocyte maturation: acquisition of developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 32(2), p. 98–103. 2020.
- RUBESSA, M. et al. Morphometric analysis of sperm used for IVP by three different separation methods with spatial light interference microscopy. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, p. 1–11. 2020.
- SIMMET, K. et al. OCT4/POU5F1 is indispensable for the lineage differentiation of the inner cell mass in bovine embryos. **The FASEB Journal**, v. 36, e. 22337. 2022.
- SOTO-HERAS, S. et al. Effect of pre-maturation with C-type Natriuretic Peptide and 3-Isobutyl-1-methylxanthine on *cumulus*-oocyte communication and oocyte developmental competence in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 202, p. 49–57. 2019.
- SOVERNIGO, T. et al. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52(4), p. 561–569. 2017.
- STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after *in vitro* maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after *in vitro* fertilization and culture. **Biology Reproduction**, v. 64, p. 904–909. 2001.

SEPÚLVEDA, B. et al. Gradient sperm selection for reproductive techniques in cattle: Is Isolate a suitable replacement for Percoll? **Andrologia**, v. 50(3) p. 1–7. 2017.

TSCHARKE, M. et al. The Phosphodiesterase Inhibitor, Isobutyl-1-Methylxanthine Prevents the Sudden Drop in Cyclic Adenosine Monophosphate Concentration and Modulates Glucose Metabolism of Equine *Cumulus*–Oocyte Complexes Matured *in Vitro*. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 91. 2020.

WOOLDRIDGE, L.K. et al. Bioactive supplements influencing bovine *in vitro* embryo development. **Journal of Animal Science**, v. 100(7). 2022.

WU, X. et al. Combined use of dbcAMP and IBMX minimizes the damage induced by a long term artificial meiotic arrest in mouse germinal vesicle oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 87(2), p. 262–273. 2020.

YANG, S. et al. Supplementation of EGF, IGF-1, and Connexin 37 in IVM Medium Significantly Improved the Maturation of Bovine Oocytes and Vitrification of Their IVF Blastocysts. **Genes (Basel)**, v. 13(5), p. 805. 2022.

ZENG, H.-T. et al. Heparin and cAMP modulators interact during pre-*in vitro* maturation to affect mouse and human oocyte meiosis and developmental competence. **Human Reproduction**, v. 28(6), p. 1536–1545. 2013.

ZENG, H.-T. et al Prematuration with Cyclic Adenosine Monophosphate Modulators Alters *Cumulus* Cell and Oocyte Metabolism and Enhances Developmental Competence of *In Vitro*-Matured Mouse Oocytes1. **Biology of Reproduction**, v. 91(2). 2014.