



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO- UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**AÇÕES DA ADIÇÃO DE *MORINDA CITRIFOLIA* (NONI) SOBRE OS
ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DE COMPLEXOS *CUMULUS*-
OÓCITO (CCOs) BOVINOS DURANTE MATURAÇÃO *IN VITRO***

São Luís- MA

2019

Breno Glaessner Gomes Fernandes de Souza

**AÇÕES DA ADIÇÃO DE *MORINDA CITRIFOLIA* (NONI) SOBRE OS
ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DE COMPLEXOS *CUMULUS*-
OÓCITO (CCOs) BOVINOS DURANTE MATURAÇÃO *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Ciência Animal da Universidade Estadual do
Maranhão, como requisito para obtenção do grau de Mestre em
Ciência Animal.

Área de concentração: Reprodução animal

Orientador: Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior

São Luís- MA

2019

De Souza, Breno Glaessner Gomes Fernandes

Ações da adição de *Morinda citrifolia* sobre os aspectos celulares e moleculares de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) Bovinos durante Maturação *in vitro*/ Breno Glaessner Gomes Fernandes de Souza – São Luís, 2019.

54

Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Ciência animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior

1. Bovinos. 2. Maturação oocitária 3. Oócitos 4. *Morinda citrifolia* 5. Antioxidante

“Não veio sobre vós tentação, senão humana; mas fiel é Deus, que não vos deixará tentar acima do que podeis, antes com a tentação dará também o escape, para que a possais suportar” 1º Coríntios

BRENO GLAESSNER GOMES FERNANDES DE SOUZA

**AÇÕES DA ADIÇÃO DE *MORINDA CITRIFOLIA* (NONI) SOBRE OS
ASPECTOS CELULARES E MOLECULARES DE COMPLEXOS *CUMULUS*-
OÓCITO (CCOS) BOVINOS DURANTE MATURAÇÃO *IN VITRO***

Defesa de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Mestrado em Ciência Animal, como requisito parcial para obtenção
do grau de Mestre em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Felipe de Jesus Moraes Junior (Orientador)
Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr. Ricardo de Macedo Chaves (1º membro)
Universidade Estadual do Maranhão

Prof. Dr. José Adalmir Torres de Souza (2º membro)
Universidade Federal do Piauí

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força em todos os momentos, pela experiência adquirida ao longo desses 2 anos e por permitir chegar aqui, encerrando mais um ciclo na minha vida.

À minha mãe, Ana Meire, por ter me incentivado e apoiado para a realização da pesquisa e conclusão do curso, por ser meu maior exemplo em determinação e dedicação ao trabalho. Muito obrigado, esta vitória é nossa.

Ao meu pai, Glaessner Fernandes, que em momentos de aflição, conseguia me tranquilizar conversando comigo. E por todo seu apoio, muito obrigado.

Ao Prof. Felipe de Jesus Moraes Junior por me orientar, pela confiança e pela oportunidade em realizar esse trabalho.

À Profa. Ana Lúcia Abreu-Silva por todo apoio para a realização da pesquisa. Por mais uma vez acompanhar seu trabalho de perto. Espero que ainda não seja a hora do “Tchau Breno”.

Aos professores que ajudaram direta ou indiretamente para a realização da pesquisa: Larissa Sarmiento, Alcina Vieira, Fernando Almeida, Helder de Moraes, Ricardo Macedo, Fábio Henrique, Solange Araújo, Tatiane Aranha.

Ao Med. Vet. Hélio responsável técnico do abatedouro municipal D.A. Vital pela disponibilidade para a coleta de material para a realização da pesquisa. Meu muito obrigado.

À toda equipe do laboratório de reprodução animal e amigos pela ajuda durante a realização do experimento, pela paciência, pelo acolhimento no laboratório, pelos momentos felizes, muito obrigado: Victoria, Daniel, Naylla, Júlia, Camila, Mikaelly, Jandyanna, Debora, Bruno, Andressa e em especial ao Sérgio, que me ajudou desde o treinamento até a realização da pesquisa, discutindo dados, me ensinando e acompanhando tudo de perto. Muito obrigado por tudo.

Aos amigos do laboratório de anatomopatologia e biologia molecular, pela vivência durante o mestrado. Obrigado pelo aprendizado e por todos os momentos descontraídos que tivemos no dia-a-dia. Muito obrigado: Allana, Isabel, Carolina, Ana Eliza, Raquel, Luis Gustavo, Orestes, Gabriel, Adriana, Nathalya, Luciana, Ana Paula, Ranielly, Gabrielly Wendell, Gleyciane, Fernanda, Ailésio, Kelvin, Daniele, Taynan, Pablo.

Aos amigos que UEMA me deu, muito obrigado pelos momentos únicos e incríveis que estivemos juntos. Cada um de vocês é especial para mim e tenho certeza que nossa amizade segue forte durante a vida. Muito obrigado: Alessandra, Scarleth, João Victor Aguiar, Talisson e João Victor Aguiar (Engenharia).

Aos amigos da turma do mestrado em ciência animal 2017-2018, pelo companheirismo e pelos momentos que estivemos juntos.

Ao Amigo Higor da Silva Ferreira, amigo de longa data que sempre esteve comigo e considero um irmão para mim, obrigado por todo companheirismo no primeiro ano e mesmo de longe, nossa confiança inabalável se manteve presente. Obrigado por tudo e pela ajuda durante o curso.

À Renata Mondego de Oliveira por ser amiga, refúgio, solução, luz e principalmente pela disponibilidade. Obrigado por toda ajuda durante esses dois anos, principalmente pelos bons conselhos e pelos momentos descontraídos que renderam muitas risadas.

Ao programa de pós-graduação Mestrado em ciência animal e ao corpo docente, por todo conhecimento compartilhado e por contribuírem para minha formação profissional.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante esses dois anos.

À coordenadora, profa. Allana Lislea e à Fran por toda ajuda durante esses dois anos.

Obrigado!

RESUMO

A melhoria na eficiência reprodutiva no rebanho bovino brasileiro possui impacto econômico significativo. A produção *in vitro* de embriões é uma biotecnologia bastante utilizada no Brasil que permite o aumento de animais por ano através da transferência de embriões obtidos em laboratório. Contudo, a produção excessiva das espécies reativas ao oxigênio pela técnica resulta em danos celulares aos oócitos e embriões, levando as células ao processo de apoptose, devido ao estresse oxidativo. O uso de antioxidantes durante os processos de maturação, fertilização e cultivo *in vitro* reduz os efeitos das espécies reativas ao oxigênio. As propriedades antioxidantes dos frutos de *Morinda citrifolia* deve-se à presença de substâncias como os compostos fenólicos, destacando-se a quercetina. O objetivo desta pesquisa é avaliar os efeitos da *Morinda citrifolia* sobre os aspectos celulares e moleculares da etapa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos. Obteve-se um total de 817 oócitos viáveis para a maturação *in vitro*, distribuídos para os tratamentos com *Morinda citrifolia* e os grupos controle. Após a etapa da maturação, determinou-se a taxa de oócitos maturados pela técnica Hoescht 33342. Alguns oócitos foram avaliados para os genes da apoptose, os genes para mensurar a ação antioxidante de *Morinda citrifolia* e o estresse oxidativo através da expressão de mRNA na técnica de qRT-PCR. Os dados da pesquisa indicam que *Morinda citrifolia* possui efeito antiapoptótico durante maturação *in vitro*.

Palavras-chave: antioxidante; *Morinda citrifolia*; Produção *in vitro*.

ABSTRACT

The improvement in reproductive efficiency in the Brazilian cattle herd has a significant economic impact. The *in vitro* production of embryos is a biotechnology widely used in Brazil that allows the increase of animals per year through the transfer of embryos obtained in the laboratory. However, excessive production of oxygen reactive species by the technique results in cellular damage to oocytes and embryos, leading to apoptosis due to oxidative stress. The use of antioxidants during *in vitro* maturation, fertilization and cultivation processes reduces the effects of oxygen reactive species. The antioxidant properties of *Morinda citrifolia* fruits are due to the presence of substances such as phenolic compounds, especially quercetin. The objective of this research is to evaluate the effects of *Morinda citrifolia* on the cellular and molecular aspects of the *in vitro* maturation stage of bovine oocytes. A total of 817 viable oocytes were obtained for *in vitro* maturation, distributed for treatments with *Morinda citrifolia* and control groups. After the maturation stage, the rate of oocytes matured by the Hoescht 33342 technique was determined. Some oocytes were evaluated for apoptosis genes, genes for measuring the antioxidant action of *Morinda citrifolia* and oxidative stress through mRNA expression in the technique of qRT-PCR. The data from research one indicate that *Morinda citrifolia* has antiapoptotic effect during *in vitro* maturation.

Key-words: Antioxidant; *in vitro* production; *Morinda citrifolia*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Representação dos grupos experimentais dos oócitos submetidos a maturação *in vitro* e tratados com diferentes concentrações de *Morinda citrifolia*. 31
- Figura 2.** Processo de obtenção dos oócitos e maturação *in vitro*. A: Ovários em PBS a 37,5°C. B: Aspiração folicular. C: Conteúdo aspirado dos ovários. D: Oócitos após o rastreamento. E: Placa de MIV com meio de maturação suplementado com *Morinda citrifolia*. F: Oócitos após 24 horas de maturação *in vitro*. 32
- Figura 3.** Coloração dos oócitos bovinos com Hoescht 33342 para avaliação dos estágios de maturação. A: Oócito em estágio de vesícula germinativa, B: Oócito em estágio intermediário com rompimento da vesícula germinativa da maturação, C: Oócito em metáfase II, D: Não Identificado/ Oócito degenerado. Objetiva 20X. 38
- Figura 4.** Expressão relativa de mRNA analisada em RT-PCR realizado em duplicata para os grupos experimentais controle 0h, controle 24h, Noni 1mg/ml e Noni 5mg/mL, para os genes Casp3, BCL2, BAX, CAT1, NrF2 e SOD1. Os dados representam média \pm desvio padrão. Asteriscos* indicam diferença estatística entre os grupos ($P < 0,05$). 41
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de genes utilizados no RT-PCR em tempo real.	34
Tabela 2. Classificação dos oócitos bovinos selecionados para a <i>maturação in vitro</i> , tratados com diferentes doses de <i>M. citrifolia</i> .	36
Tabela 3. Qualidade dos oócitos bovinos selecionados para a Maturação <i>in vitro</i> , tratados com diferentes doses de <i>M. citrifolia</i> .	37
Tabela 4. Estágios de maturação oocitária identificados na coloração Hoescht 33342 e os grupos experimentais tratados com <i>Morinda citrifolia</i> .	39
Tabela 5. Taxa de maturação dos oócitos submetidos a coloração de Hoescht 33342.	39

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

%- Percentual

°C- Graus Celsius

μL- microlitro

β-actina- Beta actina

ANOVA- Análise de variância

BAX- “Bcl-2 associated protein X”

Bcl-2- Gene: “B cell lymphoma protein 2”

Casp3- Caspase 3

CAT1- Catalase 1

CCOs- Complexo *cumulus*-oócito

CDK1- *Cyclin-dependant kinase*

cDNA- DNA complementar

CO₂- Dióxido de carbono

CIV- *Cultivo in vitro*

cm- Centímetro

EROs- Espécies Reativas ao Oxigênio

FIV- Fertilização *in vitro*

FSH- Hormônio folículo estimulante

g- Grama

GAPDH- “Human Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase”

h- Hora

H²O₂- Peróxido de hidrogênio

Km- Quilômetro

LH- Hormônio luteinizante

LHr- Receptores do hormônio luteinizante

m- Metro

MA- Maranhão

M. citrifolia- *Morinda citrifolia*

mg/kg- Miligrama por kilograma

MII- Metáfase 2

MPF- Maturation promotor factor

MIV- Maturação *in vitro*

mg/ml- Miligrama por mililitro

mm- Milímetro

mRNA- RNA mensageiro

nm- Nanômetro

Nrf-2- Nuclear fator (erythroid-derived2)

O²⁻ Radical superóxido

OH[·] - Radical hidroxila

qRT PCR- Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

PBS- Phosphate-buffered saline

PIV- Produção *in vitro*

rpm- Rotação por minuto

RVG- Rompimento da vesícula germinativa

SAS- Statistical Analysis System

SOD- Superóxido dismutase

SOD1- Gene superóxido dismutase

S.R.D.- Sem raça definida

VG- Vesícula germinativa

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 Oogênese	19
2.2 Foliculogênese	19
2.3 Maturação oocitária	21
2.3.1 Maturação nuclear	21
2.3.2 Maturação citoplasmática	22
2.3.3 Morte celular	22
2.3.4 Apoptose	22
2.4 Biotecnologias da reprodução	23
2.4.1 Produção <i>in vivo</i> de embriões	23
2.4.2 Produção <i>in vitro</i> de embriões	24
2.5 Estresse oxidativo	25
2.5.1 Espécies reativas ao oxigênio	25
2.5.2 Antioxidantes	26

2.6 <i>Morinda citrifolia</i>	26
2.6.1 Potencial terapêutico de <i>Morinda citrifolia</i>	27
2.6.2 Potencial antioxidante de <i>Morinda citrifolia</i>	28
3. OBJETIVOS	29
3.1 Geral	29
3.2 Específicos	29
4. METODOLOGIA	30
4.1 Preparo do suco do fruto de <i>Morinda Citrifolia</i>	30
4.2 Obtenção das amostras	30
4.3 Punção folicular dos ovários	30
4.4 Grupos experimentais	31
4.5 Maturação <i>In vitro</i>	31
4.6 Avaliação dos estágios de maturação nuclear	33
4.7 Extração do RNA e confecção do Cdna	33
4.7.1 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)	34
4.8 Delineamento experimental e análise estatística	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36

5.1 Qualidade dos CCOs	36
5.2 Avaliação da maturação <i>in vitro</i> dos oócitos com Hoescht 33342	37
5.3 Expressão de mRNA por qRT-PCR	40
6. CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1. INTRODUÇÃO

A pecuária é uma das atividades econômicas mais importantes no Brasil, destacando o país à nível mundial como um dos principais exportadores de carne bovina de qualidade, representando 3 % das exportações brasileiras e um faturamento de 6 bilhões de Reais (GOMES, 2017). Tanto a bovinocultura de corte, quanto a de leite atingem números satisfatórios para a economia do país. Segundo o IBGE em 2015, o Brasil atingiu a marca de 215,2 milhões de cabeças de gado. Em 1995, o número de bovinos abatidos chegou a 10 milhões de cabeças. Em 2015, esse número atingiu 26 milhões de cabeças de gado abatidas, representando um crescimento considerável ao longo desses 20 anos (GOMES, 2017).

A atividade de destaque no estado do Maranhão é a bovinocultura de corte. Segundo IBGE, em 2015 o Maranhão apresentou com crescimento de 7,9% de bovinos abatidos em relação ao ano anterior. Cerca de 472.636 bovinos foram abatidos no Maranhão nesse ano, ocupando o 12º lugar no ranking de cabeças de bovinos abatidas.

O aumento no rebanho bovino no Brasil e no estado do Maranhão pode ser justificado na aplicação de biotecnologias através de biotécnicas reprodutivas, que respondem com melhorias na produtividade, rentabilidade e eficiência reprodutiva dos animais (VISINTIN et al., 2008). Segundo a Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, este aumento está diretamente relacionado com o desenvolvimento da produção *in vitro* destes embriões (LOIOLA, 2013).

A produção *in vitro* de embriões (PIV) tem se mostrado como uma ferramenta promissora, devido à recuperação *in vivo* de oócitos de fêmeas doadoras em diferentes status reprodutivos (pré-púberes, em anestro, cíclicas, gestantes), potencializando a utilização de fêmeas com características zootécnicas desejáveis (BARUSSELI et al., 2007). Estes oócitos são fertilizados e submetidos ao cultivo *in vitro* (CIV), formando desta forma um embrião. Os embriões por sua vez desenvolvem-se até o estágio de blastocisto, tornando-se aptos para serem transferidos às fêmeas receptoras sincronizadas ou são congelados para futuras transferências (VARAGO et. al, 2008).

Dentre as biotécnicas que são aplicadas na reprodução animal, a Maturação *In vitro* (MIV) consiste no crescimento e maturação de oócitos na ausência de fatores orginários do ovário e do organismo. A MIV consiste na aspiração dos complexos *cumulus*-oócito (CCOs) dos folículos ovarianos e submetidos a cultivo em meio apropriado em condições adequadas para a maturação (CUNHA, 2014).

A MIV é uma das etapas da PIV. Esta técnica possui algumas limitações que precisam ser melhoradas e solucionadas, haja vista que a raça, estação, manejo, tipo de gonadotrofinas, conhecimento da fisiologia reprodutiva e drogas auxiliares podem influenciar negativamente nesta biotécnica. Além disso, a ausência da ação das gonadotrofinas e esteroides gonadais que estariam presentes durante a maturação oocitária no animal pode influenciar negativamente nas taxas de embrião. A produção em excesso das espécies reativas ao oxigênio (EROs) devido às concentrações diferentes de oxigênio nas incubadoras, quando comparada ao ambiente uterino das vacas, pode influenciar no processo de maturação oocitária e resultar em danos celulares aos oócitos devido ao estresse oxidativo (FONSECA, 2005).

Desta forma, pesquisas associando uma substância com propriedades antioxidantes juntamente com os meios de maturação estão sendo realizadas no intuito de minimizar os efeitos adversos que as tensões de oxigênio causam aos oócitos durante o processo de maturação. A quercetina é um flavonoide presente em frutas, vegetais, flores, grãos, e dentre suas propriedades destaca-se a atividade antioxidante (GUEMRA et al., 2013).

Morinda citrifolia (*M. citrifolia*) é uma planta que possui diversas propriedades terapêuticas e está listada como uma das plantas de interesse medicinal do medicinal no Maranhão. Seu fruto possui um suco rico em metabólitos que conferem essas propriedades medicinais, dentre eles os compostos fenólicos, ácidos orgânicos e alcaloides e dentre os compostos ativos encontrados estão cumarinas, ácidos graxos, flavonoides (Quercetina), lignanas, polissacarídeos, irridoides, antraquinonas, terpenoides e esteróis (DENG et al., 2015). No fruto as vitaminas em maior quantidade são ácido ascórbico e provitamina A. Os flavonóides são uma classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico. Eles são um grupo de substâncias naturais com estrutura fenólica variável e que possuem ação antioxidante (CHAN-BLANCO et al., 2006).

Tendo em vista que a bovinocultura de corte é uma das atividades econômicas mais importantes para o país e para o estado do Maranhão, é necessário o investimento em pesquisas para viabilizar técnicas que aumentem o número de cabeças de gado por ano. A utilização de antioxidantes sintéticos para essas pesquisas possui alto custo. A viabilização de um antioxidante baseado em recursos naturais pode causar impactos positivos para a técnica da PIV, melhorando a taxa de embriões produzidos pela técnica. Portanto, *M. citrifolia* possui esse potencial e pode contribuir com os eventos da

maturação oocitária durante o processo de maturação *in vitro*. Esta pesquisa visa contribuir cientificamente através da utilização do noni para a investigação dos aspectos celulares, como estágio de desenvolvimento do oócito e moleculares, através da detecção dos genes apoptóticos e anti-apoptóticos envolvido na maturação *in vitro* dos complexos *cumulus*-oócitos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Oogênese

O processo de desenvolvimento dos oócitos é denominado de oogênese, na qual tem início durante a vida fetal e continua após a puberdade. Complexos *cumulus*-oócito é o nome da estrutura formada pelo oócito, zona pelúcida e corona radiata. Durante a vida pré-natal, as células germinativas primordiais originárias do endoderma do saco vitelínico e na crista genital são diferenciadas em oogônias, que multiplicam-se por divisões mitóticas durante a fase de multiplicação (VAN DER HURK et al, 1997). Durante a fase de crescimento, as oogônias transformam-se em oócitos primários, iniciando a fase de maturação, onde esses oócitos sofrem divisão meiótica. A primeira divisão meiótica ocorre durante o desenvolvimento do embrião e o oócito encontra-se estacionado em prófase I na subfase de diplóteno até a fêmea atingir a puberdade (ARAÚJO et al., 2007). Esse momento é conhecido como o primeiro bloqueio da meiose, onde o oócito organiza seu núcleo em vesícula germinativa.

Após o animal atingir a puberdade, ocorre a quebra da vesícula germinativa, caracterizando o retorno a meiose e ao processo de maturação oocitária. O núcleo do oócito entra em diacinese devido a liberação da onda pré-ovulatória pelo hormônio luteinizante (LH). Com o retorno da meiose, o oócito chega a metáfase I e continua o processo de maturação normal até telófase I, onde ocorre citocinese assimétrica formando o primeiro corpúsculo polar e no oócito secundário. A segunda meiose prossegue por prófase II e metáfase II (MII), onde ocorre o segundo bloqueio da meiose e retornará a meiose somente se houver a fecundação por penetração espermática. A meiose termina em anáfase II, com a fecundação do oócito e formação do segundo corpúsculo polar (FIGUEIREDO et al., 2002).

2.2 Foliculogênese

Os folículos são estruturas funcionais do ovário que contém o líquido folicular, onde estão os oócitos. Esse líquido favorece o ambiente para a formação dos oócitos e são responsáveis pela produção de hormônios importantes para o ciclo estral das fêmeas, como o estrógeno (GORDON et al., 1994).

Na vida pré-natal, a foliculogênese é caracterizada por todos os eventos de formação, crescimento e maturação folicular, iniciando com a origem do folículo primordial e terminando com o folículo De Graaf ou pré-ovulatório. A foliculogênese é dividida em duas partes: Fase pré-antral onde ocorre a ativação dos folículos primordiais

e crescimento dos folículos primários e secundários. Estes folículos não dependem da estimulação por hormônios gonadotróficos, uma vez que estes são estimulados por fatores intraovarianos e locais; Fase antral, onde ocorre o crescimento inicial e terminal dos folículos pré-antral e antral (MAGALHÃES et. al., 2012).

A foliculogênese é caracterizada por ondas de crescimento folicular. Essas ondas ocorrem durante o ciclo estral, onde grupos de folículos iniciam o desenvolvimento sincronicamente. Estas ondas ocorrem em todos os mamíferos e promovem a ovulação de um ou mais folículos ou podem causar também atresia folicular. O fator determinante para a ovulação de um folículo ou atresia do mesmo são os níveis do hormônio progesterona, que quando estão elevados vai inibir a ovulação, promover a atresia folicular por meio da apoptose e quando os níveis de progesterona não estão elevados, os folículos podem ovular normalmente (ANTONIOLLI, 2002).

Em bovinos, o desenvolvimento dos folículos inicia com as células germinativas primordiais. Essas células quando diferenciadas em oôgonias, formam os folículos primordiais. Esses folículos primordiais possuem internamente os oócitos que estão em estado de quiescência, portanto em repouso até o estímulo necessário para o seu crescimento (DINIZ et al., 2015). Quando as células da granulosa posicionam-se ao redor do oócito e completam o número de 11 a 20 células, o folículo é chamado de folículo primário. Os folículos secundários são formados por duas ou mais camadas de células da granulosa cuboides e início da formação da zona pelúcida, enquanto os primários possuem somente uma camada de células da granulosa e não possuem zona pelúcida. Após a organização dos folículos, é formada uma cavidade chamada de antro, que é repleta de líquido, caracterizando o folículo antral (HULSHOF et al., 1994).

Os folículos secundários sofrem ação dos hormônios gonadotróficos e podem progredir para os folículos antrais. O LH apresenta uma maior importância para o desenvolvimento dos folículos uma vez que as células da teca possuem receptores para o LH (LHr). Através da biossíntese de andrógenos teca pelos LHr, pode haver estimulação de novos receptores do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) nas células da granulosa, aumentando os efeitos deste hormônio sobre os folículos secundários (VAN DER HURK, 2005). O antro acumula líquido folicular no interior das multicamadas de células da granulosa. A medida que o folículo cresce, a produção desse líquido também aumenta e esse líquido tem como função atuar como fonte de moléculas reguladoras tais como as gonadotrofinas, os esteroides, os fatores de crescimento, as enzimas, as proteoglicanas e as lipoproteínas (VAN DER HURK, 2005). Entretanto, os mecanismos de formação do

antro não são bem compreendidos, mas existem estudos *in vitro* da ação do FSH sob a formação do antro (GUTIERREZ, 2000).

O crescimento dos folículos antrais em bovinos ocorre em duas fases: Fase lenta, onde os oócitos atingem seu crescimento final e onde ocorre crescimento folicular, originando os folículos pequenos (0,3mm para 3mm de diâmetro); Fase rápida, onde os folículos pequenos tornam-se folículos dominantes (3mm para 8mm de diâmetro). Esta fase encerra com a ovulação (MIHM, 2003). O ciclo de recrutamento ocorre em ondas e são acompanhadas da seleção dos folículos antrais. Em bovinos, quando os folículos atingem 8mm é iniciada a seleção dos folículos antrais e o desenvolvimento dos receptores para LH nas células da granulosa. Esses folículos dependendo dos níveis dos hormônios gonadotróficos podem chegar até 15mm de diâmetro (VAN DER HURK, 2005).

2.3 Maturação oocitária

O processo de maturação dos oócitos *in vivo* ocorre juntamente com o desenvolvimento dos folículos. Quando os folículos chegam à fase terciária, o oócito alcança 100-120µm, onde o oócito armazena mRNA necessário para maturação oocitária e desenvolvimento embrionário inicial (LEMES, 2013).

O oócito encontra-se na fase de diplóteno da profase I quando o animal nasce e permanece nessa fase até a puberdade. Com o pico de LH, ocorre reativação do fator promotor de maturação (MPF), um complexo proteico formado por ciclina B1 e CDK1 (*cyclin-dependant kinase*). O ciclo celular é novamente estabelecido, completando a primeira meiose e a extrusão do primeiro corpúsculo polar. O oócito segue o processo de maturação até a MII, onde cessa seu desenvolvimento tornando-se apto para a fertilização. A habilidade do oócito em ser fertilizado depende dos processos de maturação citoplasmática e maturação nuclear. (SIRARD et al., 2006).

2.3.1 Maturação Nuclear

O processo de maturação nuclear resulta na divisão reducional dos cromossomos para a produção de oócitos aptos para fecundação. O processo ocorre em duas fases, a fase de crescimento e a fase de maturação final. A fase de crescimento é caracterizada por capacitar o oócito em reiniciar a meiose. A síntese protéica e a formação das mitocôndrias, ribossomos, grânulos corticais e a vesícula germinativa que contém fontes energéticas. A segunda fase, de maturação, é caracterizada pelo reinício à meiose após a puberdade, na quebra da vesícula germinativa, condensação da cromatina, formação dos

fusos da segunda divisão meiótica, seguida da extrusão do primeiro corpúsculo polar e por fim, da progressão prófase I para a MII. Neste momento, o oócito torna-se apto para ser fecundado e se ocorrer a fecundação, o segundo corpúsculo polar é formado juntamente com o zigoto (CRAN et al., 1980; EPPIG, 2001; VAN BLERKOM, 1991).

2.3.2 Maturação Citoplasmática

É o processo caracterizado pelas mudanças no formato e localização das organelas, necessárias para a aquisição de competência meiótica e capacidade de fecundação. A complexidade dos eventos que ocorrem durante a maturação depende da separação dos cromossomos da maturação nuclear, da redistribuição das organelas citoplasmáticas e do acúmulo de mRNA, proteínas e fatores de transcrição (HYTTEL et al., 1989).

A maturação citoplasmática é dividida em três eventos: Redistribuição das organelas citoplasmáticas, maturação molecular e dinâmica dos filamentos do citoesqueleto. O processo de maturação citoplasmática é uma capacitação gradual, que juntamente com a maturação nuclear, favorece a capacitação funcional do oócito e reflete em um bom desenvolvimento embrionário (FERREIRA et al., 2009).

2.3.3 Morte Celular

É o processo em que a célula perde suas funções vitais e estrutura. Este evento pode ocorrer através da necrose ou apoptose. A forma mais comum da morte celular dos oócitos e embriões é a apoptose, onde existem as reservas de ATP na célula. A necrose ocorre quando não existe ATP na célula (WYLLIE et al., 1980).

A necrose é caracterizada pela quebra da integridade membrana plasmática, ocorrendo a liberação de constituintes intracelulares para o fora da célula, estimulando a inflamação e ampliação da lesão tecidual. A apoptose por sua vez é caracterizada pela “autodigestão” das estruturas celulares, pela ativação de enzimas proteicas. A ativação dessas proteases afeta a integridade do citoesqueleto, danificando o meio intracelular sem extravasamento para o meio extracelular. Como consequência desse evento, ocorre resposta inflamatória que se expande para células vizinhas (BETTS; KING, 2001; WYLLIE et al., 1980).

2.3.4 Apoptose

A apoptose pode ser ativada de diversas formas, através de sinalização extra ou intracelular gerados pela célula, onde as caspases atuam como enzimas proteolíticas. Esse

processo é regulado pelas reservas de ATP, onde a célula é danificada internamente de forma que não causa dano ao tecido (MARTIN & GREEN, 1995; NICHOLSON & THORNBERRY, 1997; PEREZ et al., 1997). Microscopicamente, a apoptose caracteriza-se por condensação do núcleo, citoplasma e cromatina, fragmentação nuclear e agregação da cromatina, contração das organelas e do citoplasma, formação de corpos apoptóticos, colapso estrutural das células e extravasamento do conteúdo intracelular (BROOKER et al., 2005).

Os mecanismos da morte celular programada são ativados por mediadores externos e internos. Os externos estão relacionados aos receptores de superfície da membrana celular, chamados de receptores da morte. Os internos, por sua vez, são causados por lesões ao DNA, alterações no ciclo celular ou vias metabólicas que desencadeiam o estresse intracelular (CHANG et al., 2002). Esses estímulos alteram as proteínas mitocondriais relacionadas a apoptose, levando a ativação das caspases. Os mecanismos apoptóticos ocorrem de maneiras diferentes, dependendo o estágio das células e do tipo celular. Após o mecanismo ser desencadeado, as células possuem um destino em comum e irreversível, iniciando a ativação das caspases 3 e 8 (CRYNS; YUAN, 1998).

A principal família de genes envolvidas no processo de apoptose é a do Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma 2) presente no citosol e nas mitocôndrias. Os níveis das proteínas BAX e Bcl-2 determinam a susceptibilidade de uma célula a morte celular programada. As proteínas da família Bcl-2 estão inseridas em formas de dímeros ou polímeros na membrana mitocondrial e sua estrutura está diretamente relacionada com o poder de inibir ou ativar a apoptose. Ao passo que a proteína BAX possui ação pró-apoptótica, onde na presença de estímulos apoptóticos, ocorre sua translocação do citosol para as mitocôndrias e inserção nas membranas mitocondriais. Na ausência de estímulos apoptóticos, a proteína BAX encontra-se solúvel no citosol (KROEMER, 1997; WOLTER et al., 1997; ZHANG et al., 1998).

2.4 Biotecnologias da Reprodução

A aplicação de biotécnicas da reprodução em rebanhos bovinos produz ótimos resultados na eficiência produtiva e reprodutiva desses animais. O modelo de dupla hélice de DNA apresentado por Watson e Crick em 1953 é considerado o marco inicial das biotecnologias da reprodução. A primeiro relato da utilização de uma biotecnologia in

vivo foi realizado por Spallazani em 1784, onde ele coletou o sêmen de um cão, introduziu em uma cadela em estro e cerca de 62 dias depois nasceram 3 filhotes (VIEIRA, 2012).

As biotecnologias da reprodução podem ser classificadas de acordo com gerações, conforme elas progrediram ao longo dos tempos. A 1ª geração é caracterizada pelas técnicas mais antigas como a inseminação artificial, criopreservação de gametas e embriões. A 2ª geração é formada pela superovulação e transferência de embriões. A 3ª geração inclui técnicas relativamente recentes como a maturação *in vitro*, sexagem espermática e embrionária, a recuperação de oócitos, fertilização *in vitro* e a produção *in vitro* de embriões. Por fim, a 4ª geração compreende as técnicas mais recentes como a clonagem por transferência nuclear, a transgenia e o cultivo de células tronco *in vitro* (BERTOLINI e BERTOLINI, 2009).

2.4.1 Produção *in vivo* de embriões

A produção *in vivo* consiste em utilizar protocolos de superovulação em uma fêmea, submetê-la a inseminação artificial e posteriormente coletar os presumíveis embriões para transferi-los para fêmeas receptoras. Uma vaca em média produz aproximadamente 10 milhões de oócitos que podem ser fertilizados, porém, cerca de 5 oócitos são fertilizados naturalmente. Portanto, a transferência de embriões por utilização da superovulação aumenta o potencial das fêmeas de gerar indivíduos de genética superior (MORRIS et al., 2001).

2.4.2 Produção *in vitro* de embriões

A produção *in vitro* de embriões consiste em um conjunto de medidas que permitem a interação entre o espermatozoide e oócito fora da fêmea resultando na formação do embrião. A recuperação dos oócitos se dá pela aspiração folicular guiada por ultrassonografia transvaginal e posteriormente esses oócitos são submetidos às etapas da PIV (LONERGAN; FAIR, 2015). Os oócitos bovinos também podem ser obtidos pela aspiração folicular de ovários provenientes de abatedouros (GONÇALVES et al., 2007).

Esta técnica compreende as etapas de maturação *in vitro*, fertilização *in vitro* e cultivo *in vitro*. Durante a MIV, o oócito deve ser maturado para que esteja pronto para ser fecundado, através das mudanças simultâneas no citoplasma e no núcleo. Posteriormente a Fertilização *in vitro* (FIV) é realizada logo após os oócitos serem transferidos para o meio FIV, onde os espermatozoides são depositados (MACHATY et al., 2012). A CIV é a etapa onde o zigoto formado deverá sofrer clivagem até a fase de

blastocisto, onde o embrião estará formado e pronto para a transferência para uma fêmea receptora (GORDON, 2003).

A técnica da PIV está cada vez mais ganhando destaque nacional, devido ao seu potencial de melhoramento genético animal e na obtenção de diversos embriões. Em 2014 o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de embriões com 366.517 unidades produzidas por ano, cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014). Porém, a limitação de ser uma técnica cara, necessitando de profissionais experientes e controle de qualidade laboratorial para maximizar a eficiência e minimizar as perdas das amostras (NEVES et al., 2010). Contudo, as taxas médias de embriões obtidos *in vitro* ainda precisam ser estudadas visando resultados mais satisfatórios, levando em conta que a qualidade e a viabilidade dos embriões obtidos *in vitro* são inferiores à dos embriões obtidos *in vivo* (REINCHENBACH, 2003) com variação de 50 a 80% (RIZOS et al., 2002).

2.5 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo dos embriões causada pelas espécies reativas ao oxigênio é uma das limitações apresentadas pela PIV. Fisiologicamente, a atmosfera do útero apresenta cerca de 2-8% de oxigênio, concentrações bem menores que as trabalhadas nas estufas onde são realizadas a PIV. Esse excesso de oxigênio leva a formação das EROs, que pode prejudicar o desenvolvimento do embrião *in vitro* (LONERGAN e FAIR, 2008).

Em nível celular, o estresse oxidativo causa danos aos lipídios, proteínas, carboidratos e até mesmo no DNA, podendo levar ao processo de apoptose e consequente morte celular. Pode levar também ao aumento da proliferação celular, onde a célula na tentativa de se adaptar cria mecanismos de defesa contra o estresse oxidativo (ASSIS, 2014).

2.5.1 Espécies reativas ao oxigênio

As principais EROs responsáveis pelos danos aos oócitos são: radical superóxido (O_2^-), radical hidroxila (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). São substâncias produzidas naturalmente durante o metabolismo celular, onde a produção é potencializada pela alta tensão de oxigênio (O_2), ocasionando o estresse oxidativo. A peroxidação lipídica é um efeito causado pela produção excessiva EROs, que atingem os gametas e embriões durante as etapas da PIV, resultando em danos ao DNA e morte celular por necrose ou apoptose. Em condições fisiológicas normais, estudos revelam que oócitos de humanos, bovinos e suínos em condições fisiológicas normais de 2% de O_2 resulta em fosforilação oxidativa e síntese de ATP. Entretanto, 20% de O_2 utilizado nos

protocolos de PIV resulta estresse oxidativo e conseqüentemente, alterações citogenéticas. Portanto, concentrações intermediárias de O^{2-} sugerem melhores resultados para a PIV (TRINDADE et al., 2016).

As EROs possuem papel importante na ruptura dos folículos, local onde são produzidas. Porém, quando as EROs estão em maior quantidade causam estresse oxidativo nos oócitos e devem ser continuamente desativadas para manter a quantidade necessária para que as células desempenhem sua função normal (FATEHI et al., 2005). Entretanto, estudos indicam que enzimas antioxidantes endógenas e antioxidantes não enzimáticos dos folículos combatem a peroxidação lipídica. Logo, qualquer alteração que afete a atividade dessas substâncias pode levar ao aumento da atividade das EROs, aumentando o estresse oxidativo nos oócitos (GUERIN et al., 2001).

2.5.2 Antioxidantes

A substância que em baixa concentração é capaz de retardar ou prevenir a oxidação de um substrato é denominada de antioxidante (HALLIWELL et al., 2007). Durante o processo de maturação oócitaria na ampola do oviduto, os antioxidantes naturais da fêmea estão presentes. No entanto, quando os oócitos são maturados in vitro, não existe a presença dos agentes antioxidantes. Portanto, é necessário a adição de agentes que previnam a peroxidação lipídica e conseqüentemente, os danos celulares causados aos embriões e oócitos (GARDINER et al., 1995).

A principal função de um antioxidante é na remoção das EROs, através da remoção enzimática e remoção não enzimática. O superóxido dismutase (SOD), a catalase e a glutathione peroxidase são os antioxidantes enzimáticos. As vitaminas C e E, os carotenoides, tióis, melatonina e flavanoides naturais estão entre os antioxidantes não enzimáticos (CUNHA, 2014).

2.6 *Morinda citrifolia*

M. citrifolia é uma planta nativa do sudoeste da Ásia na Polinésia e que cresce também no Havá e no Brasil. Esta espécie pertence à família *Rubiaceae* e ao gênero *Morinda*, que totalizam 80 espécies diferentes, com presença em regiões tropicais no mundo todo, podendo ser encontrada na América Central, América do Sul, Austrália e na Ásia. É popularmente conhecida como “noni”, “nonu”, “amora indiana” e “fruta queijo” (THOO et al., 2013).

As árvores desta espécie possuem forma de arbusto, podendo crescer até 6 m de altura, com folhas verdes brilhantes, ovais e medindo entre 10 a 30 cm, conhecida por ter

uma alta tolerância ambiental. Suas sementes possuem coloração escura e a polpa esbranquiçada. O fruto da *M. Citrifolia* tem forma ovoíde, apresenta cor amarelada quando está maduro e verde claro quando não maturado, possui sabor adstringente quando maduro e sua semente possui um saco de ar permitindo flutuação (TORRES et al., 2017).

No Brasil, o noni possui importância comercial, visto que o seu fruto são comercializados em mercados e o suco é utilizado na produção de produtos industrializados. Devido a suas características físico-químicas, principalmente o valor nutritivo e as propriedades terapêuticas, a polpa de *M.citrifolia* é comercializada e utilizada na produção de cosméticos e produtos naturais. Em 2005 a espécie foi introduzida na cidade de São Luís do Maranhão, onde rapidamente adaptou-se às condições de clima e solo. Diversos produtos baseados no fruto do noni são comercializados em mercados pela capital e pelo interior do estado do Maranhão (SILVA, 2010).

2.6.1 Potencial terapêutico de *Morinda citrifolia*

O uso terapêutico e empírico do fruto e folhas do noni é milenar, onde fora utilizado no tratamento de feridas, doenças, dores e artrite. Atualmente esta tradição ainda é viva, com os frutos, as folhas, as sementes e as raízes utilizadas amplamente na medicina popular (BASAR et al., 2010). Entretanto, vários efeitos terapêuticos de *M. Citrifolia* já foram relatados e estudos *in vivo/ in vitro* foram realizados para demonstrar o potencial biológico do noni e seus compostos, onde obtiveram resultados positivos (WANG et al., 2002; TORRES et al., 2017). Estudos toxicológicos de *M. Citrifolia* em cultura de tecidos, na experimentação animal e em humanos revelaram que o noni não apresenta citotoxicidade em concentrações terapêuticas (WEST et al., 2006; WESTENDORF et al., 2007).

Inicialmente, os estudos explorando o potencial terapêutico de *M. Citrifolia* concentraram-se nas análises fitoquímicas dos metabólitos secundários das folhas, cascas e raízes. As folhas de *M. Citrifolia* contém iridoides, flavonoides e triterpenos, enquanto que antraquinonas (rubiadina, damnacanthal e alizarina) podem ser encontrados nas raízes (SANG E HO, 2006). Devido ao suco do noni ser utilizado como suplemento alimentar, pesquisas foram conduzidas para identificar seus constituintes metabólicos e sua toxicidade. Dentre as classes de metabólitos identificadas, as principais são polissacarídeos, ácidos graxos, iridoides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides,

lignanas, fitosteróis, carotenoides e uma variedade de constituintes voláteis, como monoterpenos e ácidos graxos voláteis de cadeia curta (SANG et al, 2002).

Dentre as propriedades terapêuticas de *M. Citrifolia*, destacam-se os potenciais antiinflamatório, antitumoral, antimicrobiano, imunomodulador, analgésico e hipotensor (CHAN-BLANCO et al. 2006; WANG et al. 2002 & Yu et al. 2008). Os efeitos benéficos do suco do noni estão atribuídos a sua composição rica em compostos fenólicos, que compõem diversas classes de substâncias naturais que não estão presentes no organismo humano. Dentre as classes dos compostos fenólicos destacam-se os flavonóides, que possui atividade antioxidante comprovada (AKIHISA et al. 2007; KAMIYA et al. 2004).

2.6.2 Potencial antioxidante da *Morinda citrifolia*

A ação antioxidante do noni é uma das propriedades de interesse para a medicina humana. Os antioxidantes naturais tem sido alvo de pesquisas recentemente devido ao menor risco de efeitos colaterais para a saúde humana, ainda que a eficácia seja inferior quando comparados com antioxidantes sintéticos (THOO et. al., 2013). Alguns compostos como glicosídeos de flavonóis, glicosídeos iridóides e antraquinonas foram identificados no suco de *M. citrifolia* através de cromatografias (WANG et al., 1999). Os flavonóides são antioxidantes efetivos devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos, protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica. A propriedade antioxidante é direcionada sobre os radicais OH⁻ e O²⁻, que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica (KANDASWAMI et al, 1994).

A quercetina (3,5,7,3'- 4'-pentahidroxi flavona) é o principal flavonóide presente no fruto e apresenta várias propriedades terapêuticas, destacando-se o potencial antioxidante (BEHLING et al., 2004).

Segundo Franchi et al. 2013, o suco de *M. citrifolia* oriundo da polinésia teve efeito antioxidante e removeu radicais livres em células somáticas da espécie *Drosophila melanogaster in vitro* através do ensaio “Terazolium nitroblue”, avaliando o potencial protetor do suco do noni de proteger células ou lipídios de alteração oxidativa promovida pelo radical ânion superóxido. Em camundongos com linfoma, o tratamento com extrato metanólico de *M. citrifolia* administrado por via oral com dose de 50mg/kg teve aumento na ação das enzimas antioxidantes catalase, glutathiona peroxidase e superóxido dismutase (ANITHA e MOHANDASS, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar o efeito da adição da *M. citrifolia* liofilizada sobre os aspectos celulares e moleculares de complexos *cumulus*-oócito (CCOs) bovinos durante o processo de maturação *in vitro*.

3.2 Específicos

- Avaliar a taxa de maturação dos CCOs submetidos a maturação *in vitro* e tratados com diferentes concentrações de *M. citrifolia*;
- Pesquisar a presença de genes apoptóticos, anti-apoptóticos e proteínas antioxidantes por meio de qRT-PCR em tempo real.

4. METODOLOGIA

4.1 Preparo do suco do fruto de *Morinda Citrifolia*

Os frutos de *M. citrifolia* provenientes da Ilha de São Luís, Maranhão, com classificação botânica do Herbário Rosa Mochel, do Departamento de Química e Biologia da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, depositados sob exsicata nº 200046 foram coletados e processados no Laboratório de Anatomopatologia, do Departamento de Patologia do Curso de Medicina Veterinária. Os frutos foram lavados com água destilada, secos com papel toalha e acondicionados em frasco de vidro estéril por dois a três dias para que o sumo seja liberado pelo fruto. O sumo do fruto foi então coletado e centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi liofilizado e o pó mantido a 4°C até o uso (ALMEIDA-SOUZA et al., 2016).

4.2 Obtenção das amostras

Os CCOs foram obtidos através da punção folicular (*Ovum pick-up*) de ovários originários de vacas S.R.D., abatidas no abatedouro municipal DA Vital, localizado na BR-135 km 03, em São Luís-MA. Esses ovários foram transportados ao laboratório de reprodução animal da UEMA, em recipiente térmico contendo solução salina-fosfato tampão (PBS) à 37°C suplementado com 10% de gentamicina (Gentrin®, Ourofino Ltda. Brasil. 100ml).

4.3 Punção folicular dos ovários

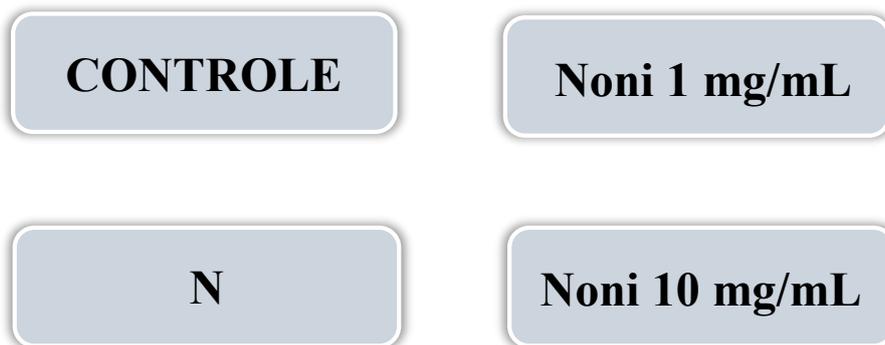
No laboratório, os ovários foram lavados com PBS a 37°C e os CCOs recuperados por aspiração folicular. Foram aspirados folículos ovarianos medindo entre 2 a 8 mm de diâmetro, utilizando agulha descartáveis 25x0,7 mm (22G), acoplado a uma seringa de 5 ml. O líquido folicular obtido na punção foi depositado em tubo do tipo Falcon de 15 ml em Banho-Maria a 37,5°C durante 10 minutos para sedimentação.

Após o tempo, o conteúdo decantado no fundo do tubo foi depositado em uma placa de Petri de 100x20 mm para pesquisa sob lupa estereomicroscópio (NOVA optical systems). Os CCOs foram classificados conforme a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (LEIDFRIED & FIRST, 1979). Somente os CCOs que apresentaram grau I e II foram selecionados e transferidos para placa de Petri 30 x 10 mm contendo meio de manutenção TCM 199 1x (gibco life technologies™, Brasil Ltda., Itapevi-São Paulo, Brasil. 500ml).

4.4 Grupos experimentais

As amostras de noni liofilizado (375mg/mL) foram diluídas em eppendorfs conforme os tratamentos: 0mg (grupo controle), 1mg/mL, 5mg/mL e 10mg/mL. Posteriormente, serão adicionados 1mL de meio de maturação (Gene-up Biotecnologia; São Paulo-SP, Brasil. 50ml) aos eppendorfs conforme os tratamentos com *M. citrifolia*. A placa de maturação foi preparada utilizando placa de petri 60x15 mm, com 4 gotas de 100 µl contendo meio de maturação suplementados com noni conforme os tratamentos descritos e recobertos em óleo mineral estéril.

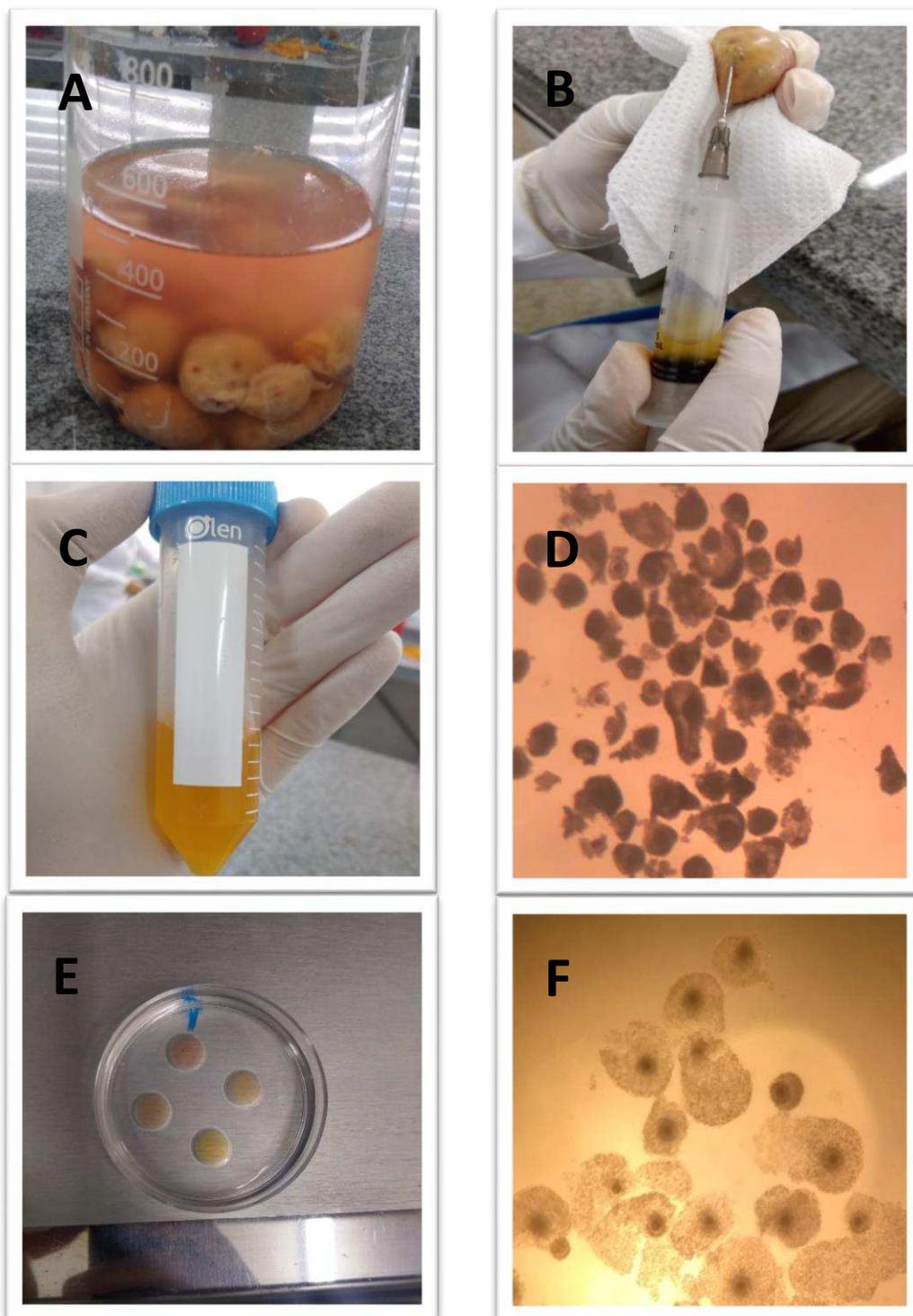
Figura 1. Representação dos grupos experimentais dos oócitos submetidos a maturação *in vitro* e tratados com diferentes concentrações de *Morinda citrifolia*.



4.5 Maturação *In vitro*

Após o rastreamento e classificação, os CCOs foram isolados através da lavagem em microgotas de 50 µL contendo meio de manutenção TCM 199 em placas de Petri de 100 x 20 mm. Após individualização dos grupos e lavagem, os CCOs foram transferidos para a placa de maturação preparada previamente e colocados em estufa B.O.D., à temperatura de 38,8°C, em atmosfera gasosa de 5% de CO₂ por 24h, iniciando o processo de maturação *in vitro*.

Figura 2. Processo de obtenção dos oócitos e maturação *in vitro*. A: Ovários em PBS a 37,5°C. B: Aspiração folicular. C: Conteúdo aspirado dos ovários. D: Oócitos após o rastreamento. E: Placa de MIV com meio de maturação suplementado com *Morinda citrifolia*. F: Oócitos após 24 horas de maturação *in vitro*.



Fonte: SOUZA (2019).

4.6 Avaliação dos estágios de maturação nuclear

A avaliação da maturação nuclear foi feita utilizando a técnica de fluorescência Hoescht 33342 (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil; 100mg;), pelos estágios de meiose dos oócitos após 24 horas de maturação. Os principais achados nucleares foram: A presença da vesícula germinativa (VG), na qual o oócito está na fase de diplóteno da profase I, com a presença de núcleo vesicular com cromossomos pouco condensados; O rompimento da vesícula germinativa (RVG), onde os cromossomos apresentam alto grau de condensação com distribuição dispersa e com núcleo de aspecto vesicular; E a presença da placa metafásica caracteriza o estágio final da maturação oocitária, onde os cromossomos formam a placa metafásica, localizada à periferia do núcleo do oócito, caracterizando a MII (HEWITT & ENGLAND, 1998).

Para retirar as células do *cumulus*, os CCOs foram incubados por 10 minutos em hialuronidase (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil; 0,2%; v/v). Adicionalmente, as células do *cumulus* foram removidas mecanicamente por turbilhamento. Após a remoção das células, os oócitos foram lavados em meio TQC para retirar o excesso de hialuronidase e incluídos em 50 µL contendo solução de Hoescht- 33342 em placa de petri 60 x 15mm. A visualização do material genético fluorescente em azul foi verificada por microscopia de epifluorescência (filtro de excitação de 365 nm e de emissão 420 nm) que indica o estágio de meiose das células. Oócitos em metáfase 2 foram considerados maduros.

4.7 Extração de RNA e confecção do cDNA

Os CCOs foram agrupados em pools de 5 CCOs, separados antes e após o processo de maturação, sendo incluídos em TRIzol Reagent[®] e congelados em nitrogênio líquido. Um total de 80 amostras foram obtidas dentre os tratamentos com *M. citrifolia*. Os oócitos tiveram seu RNA extraído utilizando clorofórmio e isopropanol, segundo protocolo. A concentração do RNA total extraído foi avaliada por espectrofotometria e a qualidade do RNA avaliada por eletroforese em gel de agarose/formaldeído. Posteriormente, realizou-se a diluição do RNA e armazenadas a -80°C.

A confecção de cDNA foi feita usando o kit TaqMan *Reverse Transcription Reagents*, seguindo as especificações do fabricante e usando uma concentração de 500 ng de RNA em uma reação com volume final de 20 µL. O cDNA foi estocado a -20°C.

4.7.1 PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A determinação quantitativa dos níveis de transcrição dos genes de interesse, a partir do cDNA, foi feita por PCR em tempo real (qRT-PCR) usando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega – USA) e o termociclador da Applied Biosystems modelo QuantStudio 3 Real-Time PCR System. Os iniciadores usados estão descritos na Tabela 1. Os resultados foram obtidos em valores de limiar de detecção (Ct - *cycle threshold*) com o software QuantStudio™ Design & Analysis v.1.4.3, e a quantificação relativa expressa por $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ usando GAPDH como gene endógeno.

Tabela 1. Lista de genes utilizados no RT-PCR em tempo real.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto	Sequência referência NCBI	de Referência no
BAX	GTGCCCCGAGTTGATCAGGAC CCATGTGGGTGTCCCAAAGT	126	NM_173894.1	Boruszewsk a et al., 2015
Bcl-2	GAGTTCGGAGGGGTCATGTG GCCTTCAGAGACAGCCAGGA	203	NM_001166486.1	Boruszewsk a et al., 2015
Casp3	TGCCACTGTATCAGGGAACA TGCTCAGCACAAACATCACA	192	NM_201107726	Saeed- Zidane et al., 2017
CAT1	TGGGACCCAACTATCTCCAG AAGTGGGTCCTGTGTTCCAG	178	NM_001035386.1	Saeed- Zidane et al., 2017
SOD1	TGCCATCGTGGATATTGTAG GCAATTCCAATTACACCACA	189	NM_174615	Saeed- Zidane et al., 2017
Nrf-2	CCCAGTCTTCACTGCTCCTC TCAGCCAGCTTGTCATTTG	165	NM_001011678	Saeed- Zidane et al., 2017
β-actina	TGTCCACCTTCCAGCAGAT TCACCTTCACCGTTCCAGT	249	NM_173979	Saeed- Zidane et al., 2017
GAPDH	GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG GCTGACAATCTTGAGGGTGTG	195	NM_001034034.2	Davies et al., 2006

4.8 Delineamento experimental e análise estatística

O delineamento foi inteiramente ao acaso com 4 tratamentos x 200, dependendo da quantidade de oócitos viáveis por coleta.

As variáveis taxa de maturação e estágios da meiose foram submetidas ao teste de normalidade. Realizou-se a análise de variância (ANOVA) e os dados qualitativos

foram comparados pelo teste do χ^2 , considerando $P < 0,05$. As análises foram executadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2015).

Os dados da expressão de mRNA por RT-PCR foram avaliadas pelo teste Kruskal-Wallis e o teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos experimentais. As análises foram executadas utilizando o software graph pad prism 5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Qualidade dos CCOs

Foram realizadas 18 baterias de Maturação *in vitro* de oócitos bovinos, nos quais obteve-se um total de 681 ovários viáveis para a aspiração folicular. O peso inicial médio dos ovários (antes da aspiração folicular) foi de 369,90 g, enquanto que o peso final médio dos ovários (Após a aspiração folicular) foi de 312,70 g, obtendo-se 0,17 oócitos/ grama de ovário.

Obteve-se um total de 817 estruturas viáveis para a MIV e elas foram divididas entre os 4 tratamentos de *M. citrifolia*. A tabela 2 ilustra a qualidade dos oócitos selecionados para a MIV.

Tabela 2. Classificação dos oócitos bovinos selecionados para a *maturação in vitro*, tratados com diferentes doses de *M. citrifolia*.

Dose Noni	GI	GII	GIII	GIV	TOTAL
0mg/mL	122	51	29	0	202
1mg/mL	119	70	16	0	205
5mg/mL	135	48	18	0	201
10mg/mL	129	57	23	0	209

Legenda: GI: oócito Grau 1; GII: oócito Grau 2; GIII: oócito Grau 3; GIV: oócito Grau 4.

A avaliação da qualidade dos oócitos bovinos é importante para definir quais oócitos estão aptos para o processo de maturação. São considerados oócitos de alta qualidade os oócitos que apresentarem graus I e II. São considerados oócitos de baixa qualidade os que apresentarem graus III e IV (SIRARD, 2001). A tabela 3 ilustra a qualidade dos oócitos submetidos a MIV, baseada nessa classificação.

Tabela 3. Qualidade dos oócitos bovinos selecionados para a Maturação *in vitro*, tratados com diferentes doses de *M. citrifolia*.

Dose Noni	CCOs com alta qualidade	CCOs com baixa qualidade
0mg/mL	86%	14%
1mg/mL	92,20%	7,80%
5mg/mL	91%	9%
10mg/mL	89%	11%

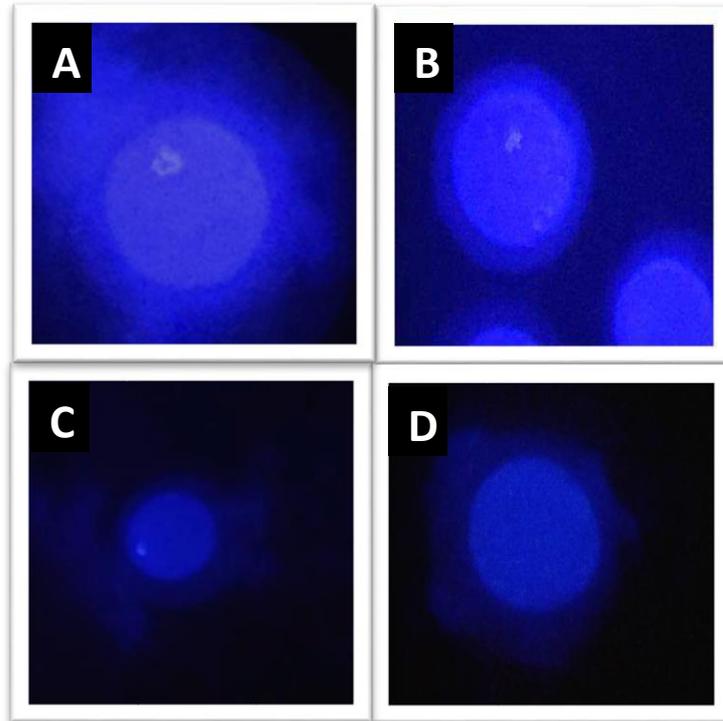
Legenda: CCOS: Complexo *Cumulus*-oócito.

Após 24 horas do início da maturação *in vitro*, é necessário realizar a avaliação dos oócitos para verificar o estágio de maturação em que se encontra a célula. A coloração Hoescht 33342 é realizada para corar oócitos e embriões submetidos ao processo de maturação.

5.2 Avaliação da maturação *in vitro* dos Oócitos com Hoescht 33342

Os resultados do Hoescht 33342 foram classificados conforme os achados nucleares dos oócitos. O estágio de VG é caracterizado pela presença de núcleo desenvolvido, porém imaturo. O oócito encontra-se na fase de diplóteno da Prófase I. Estruturas encontradas nesse estágio não obtiveram maturação oocitária. O rompimento da vesícula germinativa (RVG) é caracterizado por estruturas que entraram em metáfase I, onde a vesícula apresenta aspecto fragmentado. O núcleo é caracterizado como um ponto fluorescente com aspecto granulado mais próximo ao centro da célula. Por fim, a metáfase II é caracterizada pelo fim da maturação. Estruturas com ponto fluorescente próximo a membrana plasmática estão em MII, portanto, concluíram o processo de maturação. A figura 2 ilustra os estágios de maturação oocitária.

Figura 3. Coloração dos oócitos bovinos com Hoescht 33342 para avaliação dos estágios de maturação. A: Oócito em estágio de vesícula germinativa, B: Oócito em estágio intermediário com rompimento da vesícula germinativa da maturação, C: Oócito em metáfase II, D: Não Identificado/ Oócito degenerado. Objetiva 20X.



Fonte: SOUZA (2019).

Obteve-se poucos oócitos em estágio de VG e RVG (Tabela 4), indicando que os oócitos iniciaram a meiose, porém não completaram o processo. No entanto, obteve-se um grande número de oócitos sem estágio nuclear identificável e degenerados (NI). Não houve diferença estatística significativa para os achados nucleares entre os grupos tratados com *M. citrifolia*. O experimento de Santos et al. 2002 obteve menores taxas de oócitos degenerados/ não identificados com tempos de maturação in vitro reduzido. Paschoal em 2013 relatou que obteve maior taxa de oócitos degenerados com o tempo de 24h. Portanto, é necessário realizar mais testes para determinar o tempo ideal para a maturação in vitro dos oócitos tratados com *M. citrifolia*, no intuito de aumentar o número de oócitos em MII e diminuir o número de oócitos degenerados.

Tabela 4. Estágios de maturação oocitária identificados na coloração Hoescht 33342 e os grupos experimentais tratados com *Morinda citrifolia*.

TRAT	VG	RVG	MII	NI	Total
0mg/mL	14 ^A	7 ^A	106 ^A	75 ^A	202
1mg/mL	8 ^A	2 ^A	121 ^A	74 ^A	205
5mg/mL	7 ^A	5 ^A	103 ^A	86 ^A	201
10mg/mL	12 ^A	6 ^A	119 ^A	72 ^A	209

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no teste de χ^2 ($P < 0,05$) entre os tratamentos. Legenda: TRAT: Tratamento VG: Vesícula germinativa; RVG: Rompimento da vesícula germinativa; MII: Metáfase 2; NI: Não identificado.

A taxa de maturação indica o percentual de estruturas que completaram o processo de maturação, identificadas no estágio de Metáfase II. A tabela 5 ilustra o percentual de estruturas maturadas submetidas a coloração de Hoescht.

Tabela 5. Taxa de maturação dos oócitos submetidos a coloração de Hoescht 33342.

Dose noni	Total de Oócitos	Óocitos maturados	Tx. De maturação
0mg/mL	202	106	53% ^A
1mg/mL	205	121	59% ^A
5mg/mL	201	103	51% ^A
10mg/mL	209	119	57% ^A

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no teste de χ^2 ($P < 0,05$) entre os tratamentos.

Segundo análise estatística deste estudo para avaliação da maturação nuclear dos CCOs (Tabela 5), observou-se que a suplementação dos meios de maturação com *M. citrifolia* ou sem o fitoterápico, não provocou diferença significativa nas taxas de maturação nuclear. Estes dados indicam que a *M. citrifolia* como antioxidante não provocou melhorias significativas na taxa de maturação dos oócitos. Porém, a literatura relata que a presença de antioxidante durante a maturação in vitro é essencial para maturação citoplasmática, resultando em melhores taxas de embriões (FURNUS et al., 2008; SILVA et al., 2011).

Dentre as dificuldades nas pesquisas envolvendo etapas da PIV, está no sucesso em obter boas taxas de maturação dos oócitos. Fatores como o manejo nutricional adequado, assim como a perda da interação hormonal e molecular entre os oócitos e as células foliculares no ambiente intrauterino das vacas pode ter influenciado nos resultados do experimento. A ausência do ambiente folicular pode levar a perda da qualidade funcional dos oócitos, influenciando nos resultados obtidos na etapa da MIV (GOTTARDI; MINGOTI, 2009).

No entanto, os oócitos somente reiniciam a meiose quando saem dos folículos ovarianos, onde existem fatores que bloqueiam a meiose, nas quais são inativados com estímulos hormonais com o surgimento da onda de crescimento folicular (PINCUS; ENZMANN, 1935).

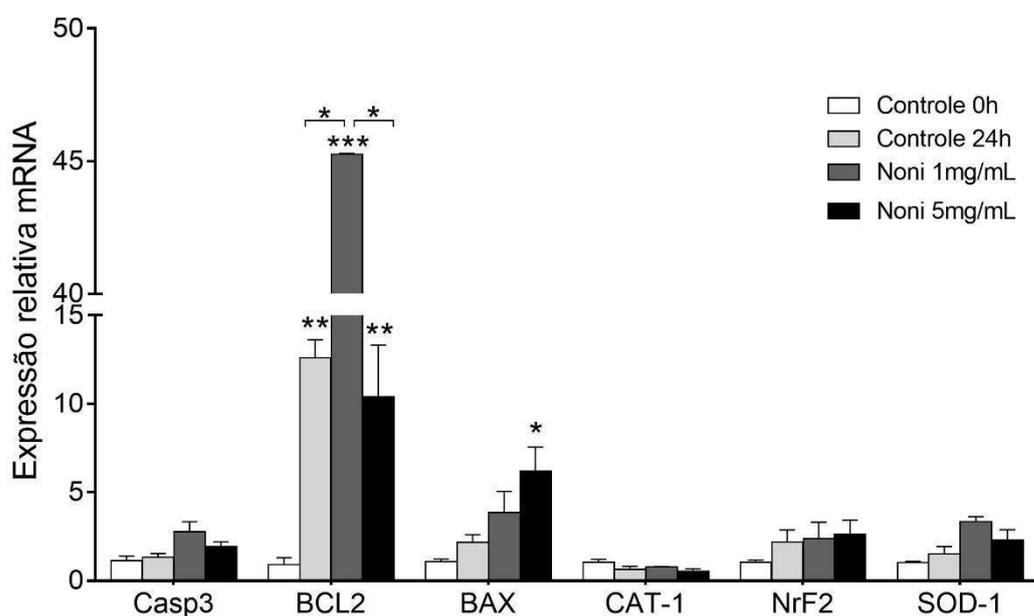
Estudos envolvendo a utilização de antioxidantes na maturação *in vitro* já foram realizados anteriormente obtendo bons resultados (GUEMRA et al., 2013; GAD et al., 2018). Assim como também existem estudos que demonstram a ação da quercetina como um potencial antioxidante. A quercetina é um dos principais metabólitos com ação antioxidante presentes na *M. citrifolia*. Em um experimento com PIV, a quercetina foi capaz de promover melhorias nas taxas de embriões quando utilizada durante a etapa da maturação *in vitro* (GUEMRA et al., 2013). A quercetina sintética promoveu a inibição de radicais livres em um estudo relatado por Braun et al. 2011. No estudo *in vivo* com camundongos, a quercetina foi capaz de reduzir danos celulares aos hepatócitos (LIU et al., 2010). Desta forma, esse estudo é pioneiro em utilizar o noni como antioxidante durante a MIV.

Tendo em vista que a *M. citrifolia* possui outros compostos químicos que podem atuar sinergicamente com a quercetina, existem também diversos metabólitos secundários que podem influenciar negativamente o processo da MIV. Portanto, uma análise da ação da quercetina extraída do suco do fruto de *M. citrifolia* na maturação *in vitro*, poderia trazer resultados complementares para esta pesquisa.

5.3 Expressão de mRNA por qRT-PCR

A análise da expressão do mRNA dos oócitos desta pesquisa revelou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais para os genes Bcl-2 e BAX. A amostra do grupo tratado com *M. citrifolia* dose 10 mg/mL não obteve expressão para os controles endógenos, não apresentando amplificação. A Figura 3 ilustra os resultados obtidos para mRNA na RT-PCR.

Figura 3. Expressão relativa de mRNA analisada por qPCR realizado em duplicata para os grupos experimentais controle 0h, controle 24h, Noni 1mg/mL e Noni 5mg/mL, para os genes Casp3, BCL2, BAX, CAT1, NrF2 e SOD1, e GAPDH como gene endógeno. Os dados representam média \pm desvio padrão. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado com o controle 0h ou entre os colchetes, após análise de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn.



O grupo controle 24h e o grupo noni 5mg/mL apresentaram boas expressões de mRNA para o gene BCL-2, sendo diferentes estatisticamente dos grupos controle 0 h e noni 1mg/mL. O grupo Noni 1mg/mL apresentou expressões elevadas de BCL-2, sendo distinto dos demais grupos. O gene BCL-2 foi utilizado na pesquisa no intuito de verificar os mecanismos anti-apoptóticos após os eventos da MIV.

Os genes pró-apoptóticos casp3 e BAX obtiveram expressões de mRNA baixas quando comparados ao gene anti-apoptótico BCL-2. As expressões do grupo controle 0h para o gene BCL-2 foram baixas em comparação aos demais grupos (Controle 24h, noni 1mg/mL e noni 5mg/mL). Todavia, os dados mostram que as amostras das células de todos os grupos obtiveram expressões de mRNA baixas para o gene Casp3 e relativamente baixas para o gene BAX, na qual ambos são genes pró-apoptóticos (BAX e Casp3). Essa análise revela que após a maturação *in vitro*, os oócitos ativam mecanismos contra a apoptose, uma vez que o aumento da produção das EROs durante a MIV, causam danos celulares aos oócitos e podem levar a morte celular (TRINDADE et al., 2016). Portanto, essas informações indicam que o tratamento com *M. citrifolia*

desempenhou um papel importante de proteção dos oócitos contra a apoptose durante a MIV, evidenciado principalmente pela expressão de mRNA do grupo noni 1mg/mL.

O grupo tratado com noni 5mg/mL obteve expressão de mRNA relativamente alta para o gene BAX, obtendo diferença estatística significativa em relação aos demais grupos. No entanto, esse mesmo grupo obteve alta expressão de mRNA para o gene BCL-2. A natureza de ambos os genes são opostas, onde um atua em favor da morte celular (BAX) e o outro atua nos mecanismos antiapoptóticos (BCL-2). Vale ressaltar que o gene BAX é derivado do gene BCL-2, pertencendo a mesma família. Os genes BAX e BCL-2 possuem relação inversa para a expressão de mRNA, na qual resulta na prevenção da liberação do citocromo-c (BORNER, 2003; HENGARTNER, 2000), que por sua vez leva a ativação da Caspase 3 (Proteína efetora da apoptose). A enzima Caspase aumenta a permeabilidade da membrana mitocondrial e estabelece a chamada morte celular caspase dependente (KUMAR, 2007). Esse fator explica a baixa expressão de Casp 3 nessa pesquisa, devido aos níveis distintos da expressão de mRNA dos genes BCL-2 e BAX.

Os genes NrF-2, CAT1 e SOD1 foram utilizados no intuito de avaliar a ação antioxidante de *M. citrifolia* e medir o estresse oxidativo causado às células. Não houve diferença estatística significativa para nenhum dos genes avaliados nesta pesquisa, porém é possível notar que na expressão de mRNA, para o gene SOD1 foi relativamente maior para o grupo 1mg/ML, quando comparado ao controle 24 horas. A expressão do gene SOD1 indica a ação da enzima superóxido dismutase que atua na detoxificação de radicais livres (HALLIWELL et al., 2007).

6. CONCLUSÃO

Os tratamentos utilizados neste trabalho com *M. citrifolia* não evidenciaram a ação antioxidante sobre a morfologia dos oócitos maturados *in vitro*. A expressão de mRNA do gene BCL-2 evidenciou que a *M. citrifolia* desempenhou função antiapoptótica sobre os aspectos moleculares dos oócitos maturados *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- ADASHI, E.Y.; ROCK, J.A. & ROSENWAKS Z. The ovarian follicular apparatus. **Reproductive Endocrinology Sugery, and technology**. New York, NY: Lippincott-Raven. P.18-40 1995.
- AKIHISA, T.; MATSUMOTO, K.; TOKUDA, H.; YASUKAWA, K.; SEINO, K.-I.; NAKAMOTO, K.; KUNINAGA, H.; SUZUKI, T. & KIMURA, Y. Anti-inflammatory and Potential Cancer Chemopreventive Constituents of the Fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Natural Products** p.754-757. 5. 2007.
- ALMEIDA-SOUZA, F. et al. *Morinda citrifolia* Linn. fruit (Noni) juice induces an increase in NO production and death of *Leishmania amazonensis* amastigotes in peritoneal macrophages from BALB/c. **Nitric Oxide**, v. 58, p. 51-8, Aug 2016. ISSN 1089-8611. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27328771> >
- ANITHA T. & MOHANDASS S. Anti-oxidant activity of *Morinda citrifolia* on lymphoma-bearing mice. **Ancient Science Life** 26: 85–88, 2006.
- ANTONIOLLI, C.B. Desenvolvimento folicular, ondas foliculares e manipulação. **Endocrinologia da reprodução**, UFRGS 2002.
- ARAÚJO C.H.M.; ARAUJO, M.C.P.; MARTINS W.P.; FERRIANI, R.A. & REIS, R.M. Gametogênese: Estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. **Medicina (Ribeirão Preto)** 40 (4): 551-8, out./dez. 2007.
- ASSIS, P. M. Melatonina no cultivo *in vitro* de embriões bovinos: dinâmica e a ação antioxidante. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade de São Paulo, 2014.
- BASAR S.; UHLENHUT, K. & HOGGER, P. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) **Phytotherapy Research**. 24: 38–42, 2010.
- BEHLING, B.E.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M.G. & BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**., Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BERTOLINI, M. & BERTOLINI, L.R. Advances in reproductive technologies in cattle from artificial insemination to cloning. **Revista de Medidica Veterinária e Zootecnia** v.56, p. 184-94, 2009.

BETTS, D.H.; KING, W.A. Genetic regulation of embryo death and senescence. **Theriogenology**, Los Altos, v.47, p.13-22, 1997.

BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**. v.39, p.615-647, 2003.

BORUSZEWSKA, D.; SINDEREWICZ, E.; KOWALCZYK-ZIEBA, L.; GRZYCMACHER, K. & WOCLAWEK-POTOCKA, I. The effect of lysophosphatidic acid during *in vitro* maturation of bovine cumulus–oocyte complexes: cumulus expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence.. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 13: 44, may 16 2015.

BRAUN, K.F.; EHNERT, S.; FREUDE, T. et al. Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1. **Scientific World Journal**, v.11, p.2348-2357, 2011.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A.M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J.M. & BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia L.*): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal Food Compos Anal** 19: 645-654, 2006.

CHANG, S.H. et al. The effector phase of physiological cell death relies exclusively on the posttranslational activation of resident components. **Experimental Cell Research**, New York, v.277.

CRAN, D.G.; MOOR, R.M.; HAY, M.F. Fine structure of the sheep oocyte during antral follicle development. **Journal of Reproduction and Fertility** v.59, p.125-132, 1980.

CRYNS, V.; YUAN, J. Proteases to die for. **Genes Development**, New York, v.12, n.11, p.1551-1570, 1998.

CUNHA, M.C.R.V. A melatonina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. **Dissertação (mestrado)**. Faculdade de Zootecnia e Engenharia De Alimentos- Universidade de São Paulo, 2014.

DAVIES, C. J.; ELDRIDGE, J. A.; FISHER, P. J.; SCHLAFER, D. H. Evidence for expression of both classical and non-classical major histocompatibility complex class I

genes in bovine trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.55, p.188–200, 2006.

DENG, S.; CHEN, C. S. & YANG, J. Chemistry of Medicinal Plants, Foods, and Natural Products 2015. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, 2015.

DINIZ, E.G.; ESPER, C.R.; JACOMINI, J.O. & VIEIRA, R.C. Desenvolvimento morfológico dos ovários em embriões e fetos bovinos da raça nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.70-76, 2005.

EPPIG, J.J. Maintenance of meiotic arrest and the induction of oocyte maturation in mouse oocyte-granulosa cell complexes developed in vitro from antral follicles. **Biology of Reproduction**, v.45, p.824-830, 1991.

FATEHI, A. N.; ROELEN, B.A.; COLENBRANDER, B.; SCHOEVERS, E. J.; GADELLA, B. M.; BEVERST, M. & VAN DER HURK, R. Presence of *cumulus cells* during *in vitro* fertilization protects the bovine oocyte against oxidative stress and improves first cleavage but does not affect further development. **Zygote**, v.13, p.177-185, 2005.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p.836-848, 2009.

FIGUEIREDO, J. R.; RODRIGUES, R. A. N. & AMORIM, C. A. Manipulação de ovócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. **Biotécnicas Aplicada a Reprodução Animal** v.1; cap. 11, p. 227-260, 2002.

FONSECA, J.F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e 317 caprinos. **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, n.16, Anais: Palestras. 2005.

FRANCHI, L.P.; GUIMARÃES, N.N.; DE ANDRADE, L.R. Antimutagenic and antirecombinagenic activities of noni fruit juice in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 85: 585–594, 2013.

FURNUS, C.; DE MATOS, D.G.; PICCO, S. et al. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.109, p.88-99, 2008.

GAD, A.; ABU HAMED, S.; KHALIFA, M.; AMIN, A.; EL-SAYED, A.; SWIEFY, S.A.; EL-ASSAL, S. Retinoic acid improves maturation rate and upregulates the expression of antioxidant-related genes in *in vitro* matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **International Journal of Veterinary Science Medicine** Sep 15;6(2):279-285, 2018.

GARDINER, C. S. & REED, D. J. Synthesis of glutathione in the preimplantation mouse embryo. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, p. 30-36, 1995.

GIMENES, L.A.C.; FERREIRA, L.P.; MENDES, N.S.; MORAES, F.T. & REIS, C.N. Atividade antioxidante in vitro de *Morinda Citrifolia* L (Noni). **XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. FAURGS, Gramado/RS OUT 2016.

GOMES, R.C.; FEIJÓ, G.L.D.; CHIARI, L. Evolução e qualidade da pecuária Brasileira. **Embrapa Gado de corte**, Campo Grande-PB 2017.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R. & FREITAS, V.J.F. Produção *in vitro* de embriões. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2ed., São Paulo, Editora Roca LTDA. P.195-224, 2007.

GORDON, I. Laboratory production of cattle embryos. Maturing the bovine oocytes. **2 edition Cambridge University Press**, cap. 4. 112-157, 2003.

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

GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S. & P.R., ADONA. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

GUERIN, P. E. L.; MOUTASSIM, S. & MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**, v.7, p.175-189, 2001.

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; Wilmut, I. & Webb, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. **Biology Reproduction** 62(5):1322-8. 2000.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J. Free Radicals in Biology and Medicine. 4. Ed. **Oxford: Oxford University Press**, 2007.

HENGARTNER, M.O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, p.770-776, 2000.

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. **Veterinary Record**, v.143, p.590-591, 1998.

HULSHOF, S.C.J., FIGUEIREDO, J.R., BECKERS, J.B. Isolation and characterization of preantral follicles from foetal bovine ovaries. **Quarterly Journal of Veterinary Science**, v. 16,p.78-80, 1994.

HYTTEL, P.; GREEVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 38, p. 35-47, 1989.

IETS. Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals. **Embryo Transfer Newsletter**, v. 32, p. 14-26, 2014.

KAMIYA, K.; TANAKA, Y.; ENDANG, H.; UMAR, M.; SATAKE, T. Chemical Constituents of *Morinda citrifolia* Fruits Inhibit Copper-Induced Low-Density Lipoprotein Oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 52, 5843–5848. 2004.

KANDASWAMI, C. & MIDDLETON, E.JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, New York, v. 366, p. 351-376, 1994.

KROEMER, G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. **Natural Medical**, New York, v.3, p.614-620, 1997.

KUMAR, S. Caspase function in programmed cell death. **Cell Death Differ.**14.32-43, 2007.

LEMES, R.C. Análise do perfil de expressão gênica de oócitos bovinos advindos de complexos *cumulus*-oócito com diferentes qualidades morfológicas. **Dissertação** de mestrado da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto, 2013.

LIU, S.; HOU, W.; YAO, P. et al. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. **Toxicology *In vitro***, v.24, p.516- 522, 2010.

LOIOLA, M.V.G. Validação de um programa de produção *in vitro* de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias. **Dissertação de Mestrado em Reprodução Animal** (Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia), Universidade Federal da Bahia- Salvador, 2013.

LONERGAN, P.; FAIR, T. *In vitro*- produced bovine embryos: dealing with the warts. **Theriogenology**, v.69, n.1, p. 17-22, 2008.

LONERGAN P. & FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v.4, p.255-68, 2015.

MACHATY, Z.; PEIPPO J., PETER S. Production and manipulation of bovine embryo: techniques and terminology. **Theriogenology**, 78:937-950, 2012.

MAGALHÃES, D.M.; Sales, E.T.; Padilha, R.T.; Silva, T.F.P.; Tonioli, R. & Figueiredo, J.R. Hormônio do crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante à insulina-I (IGF-D): importantes reguladores das foliculogêneses *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.36, p.32-38, 2012.

MIHM, M. & BLEACH, E.C. Endocrine regulation of ovarian antral follicle development in cattle. **Animal Reproduction Science**. 78(3/4):217-37, 2003.

MORRIS, D.G.; DISKIN, M.G. & SREENAM, J.M. Biotechnology in cattle reproduction. **Beef Production**, series n° 39, 2001.

MARTIN, S. J.; GREEN, D. R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. **Cellular**, v.82, p.349-352, 1995.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L. & TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de zootecnia**. V.39.p.418. Brasília-DF, 2010.

NICHOLSON, D. W.; THORNBERRY, N. A. Caspases: killer proteases. **Trends in Biochemical Science**, v.8, p.299-306, 1997.

PASCHOAL, D.M.; Ação do Forskolin em diferentes fases da produção *in vitro*: implicação na meiose oocitária e na vitrificação de embriões bovinos. **Tese de doutorado**. Universidade Estadual Paulista, 2013.

PEREZ, G. I.; KNUDSON, C. M.; LEYKIN, L.; KORSMEYER, S. J.; TILLY, J. L. Apoptosis-associated signaling pathways are required for chemotherapy-mediated female germ cell destruction. **Natural Medical**, v.3, p.1228-1332, 1997.

PINCUS G., ENZMANN, E.V. The comparative behaviour of mammalian eggs *in vivo* and *in vitro*: I. The activation of ovarian eggs. **The Journal of Experimental Medicine** 62(5), 665-675, 1935.

REINCHENBACH , H.D. Embryo transfer and cryopreservation in cattle: practical considerations. **Acta Scientiae Veterinariae**, 31: p. 28-50. 2003.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M. P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: implications for blastocysts yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 61, n. 2, p. 234-248, 2002.

SAEED-ZIDANE, M.; LINDEN, L.; SALILEW-WONDIM, D.; HELD, E.; NEUHOFF, C.; THOLEN, E.; HOELKER, M.; SCHELLANDER, K. & TESFAYE, D. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **Plos One**. November 8, 2017.

SANG, S. Chemical components of noni fruits and leaves (*Morinda citrifolia* L.). **ACS Symposium Series**, v. 803, p. 134-150, 2002.

SANG, S. & HO, C.T. Chemical components of noni (*Morinda citrifolia* L.) root. **ACS Symposium Series**, v. 925, p. 185-194, 2006.

SANTOS, S.S.D.; DANTAS, J.K.; MIRANDA, M.S.; BIONDI, F.C.; OHASHI, O.M. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.39 n.5 São Paulo.2002.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE A.B.G. et al. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.315-326, 2011.

SILVA, J.J.M. Adubação Orgânica e Mineral de Noni: Desempenho Agrônômico, Nutrição da Planta, Qualidade de Fruto e de Suco. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal da Paraíba, Areia, 2010.

SIRARD, M.A. et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, n.1, p.126-36, 7 jan. 2006.

THOO Y.Y., HO S.K., ABAS F. Optimal binary solvent extraction system for phenolic antioxidants from mengkudu (*Morinda citrifolia*) fruit. **Molecules** 18: 7004–7022, 2013.

TORRES, M.A.O.; MAGALHÃES, I.F.B.; MÔNDEGO-OLIVEIRA, R.; SÁ, J.C.; ROCHA, A.L. & ABREU-SILVA, A.L. One plant, many uses: A review of the pharmacological applications of *Morinda citrifolia*. **Phytotherapy Research**. 31:971-979. 2017.

TRINDADE, M.C.; MACENTE, B.I.; VICENTE, R.R.; APPARÍCIO, M. Estresse oxidativo na produção *in vitro* de embriões bovinos: revisão de literatura. **Revista investigação veterinária- Medicina Veterinária**. 5(1): 37-45, 2016.

VAN BLERKOM, J. Microtubule mediation of cytoplasmic and nuclear maturation during the early stages of resumed meiosis in cultured mouse oocytes. **Proceedings National Academy of Sciences USA**, v.88, p.5031-5035, 1991.

VAN DER HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J. F. *In vivo* and *in-vitro* development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p. 73-82, 1997.

VAN DER HURK, R. & ZHAO J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology** ;63(6):1717-51, 2005.

VIEIRA, R.J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: Generalidades. **Ciência Animal**, 22(1): 55-65, Edição Especial, 2012.

VISINTIN, J.A.; MELLO, M.R.B.; MILAZZOTTO, M.P. & ASSUMPCÃO, M.E.O.D. Clonagem e transgenia animal. **Ciência veterinária nos Trópicos**, Recife-PE, v. 11, suplemento 1, p.139-144, abril, 2008.

WANG, M. F.; KIKUZAKI, H.; CSISZAR, K.; BOYD, C. D.; MAUNAKEA, A.; FONG, S. F. T.; GHAI, G.; ROSEN, R. T.; NAKATANI, N.; HO, C. T. Novel trisaccharide fatty acid ester identified from the fruits of *Morinda citrifolia*. **J. Agricultural Food Chemistry**. 1999, 47, 4880- 4882.

WANG, M.Y., WEST, B.J., JENSEN, C.J. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. **Acta Pharmacologica Sinica** 12: 1127–1141 2002.

WEST B.J., JENSEN C.J., WESTENDORF J. A safety review of noni fruit juice. **Journal of Food Science** 71: R100–R106, 2006.

WESTENDORF J., EFFENBERGER K., IZNAGUEN H. . Toxicological and analytical investigations of noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. **Journal of Agricultural Food Chemistry** 55: 529–537, 2006.

WOLTER, K.G. et al. Movement of Bax from cytosol to mitochondria during apoptosis. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.139, n.5, p.1281-1292, 1997.

WYLLIE, A.H.; KEER, J.F.R.; CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **International Review of Cytology**, New York, v.5, p.97-104, 1980.

YU H., LI S., HUANG M.T. & HO C.T. Antiinflammatory constituents in noni (*Morinda citrifolia*) fruits, Dietary Supplements. **American Chemical Society**, p. 179-190, 2008.

ZHANG, G. et al. Caspase inhibition prevents staurosporine-induced apoptosis in CHO-K1 cells. **Apoptosis**, New York, v.3, n.1, p.27-33, 1998.