

UNIVERSIDADE DE UBERABA

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SANIDADE E PRODUÇÃO ANIMAL NOS
TRÓPICOS (PPGSPAT) - MESTRADO**

MYLENA MARTINS COELHO-VINHAIS

**SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO DE
Moringa oleifera EM MEIOS DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS**

UBERABA-MG

2025

MYLENA MARTINS COELHO-VINHAIS

**SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO DE
Moringa oleifera EM MEIOS DE MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba (Uniube) como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Orientador: Prof. Dr. Ian Martin

Coorientadora: Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar

UBERABA-MG

2025

Catalogação elaborada pelo Setor de Referência da Biblioteca Central UNIUBE

Coelho-Vinhais, Mylena Martins.
C65s Suplementação com diferentes concentrações do extrato de *Moringa oleifera* em meios de maturação *in vitro* de óócitos bovinos. / Mylena Martins Coelho-Vinhais. – Uberaba (MG), 2025.
72 f. : il., color.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Uberaba. Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos.
Orientador: Prof. Dr. Ian Martin.
Coorientadora: Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar.

1. Reprodução animal. 2. Vacas – Reprodução. 3. Antioxidantes. 4. Estresse oxidativo. I. Martin, Ian. II. Bittar, Joely Ferreira Figueiredo. III. Universidade de Uberaba. Programa de Pós -Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos. IV. Título.

CDD 636.082

Tatiane da Silva Viana – Bibliotecária – CRB-6/3171

MYLENA MARTINS COELHO VINHAIS

SUPLEMENTAÇÃO COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO DE *Moringa oleifera* EM MEIOS DE MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos do Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos da Universidade de Uberaba.

Área de concentração: Sanidade e Produção Animal nos Trópicos

Aprovada em: 30/06/2025

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Ian Martin
Universidade de Uberaba

Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves
Universidade de Uberaba

Profª. Drª. Cássia Maria Barroso Orlandi
Universidade Brasil

DEDICATÓRIA

À minha base, meu esposo Anderson Filho e minha filha Manuela, que iluminam minha vida com amor, alegria e desafios, tornando cada momento único e especial.

Aos meus pais, Andréia e Carlos, que sempre me apoiaram incondicionalmente e me ajudaram a perseguir meus sonhos.

Aos meus sogros, Cristiana e Anderson, à minha irmã Karla e ao meu cunhado Lucaciano, pelo constante encorajamento e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu orientador e segundo pai, Ian, por me ensinar tanto, por me apoiar em cada passo e por tornar esta jornada mais leve e significativa.

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Jesus, por me ouvir nos momentos de angústia, por iluminar e direcionar meu caminho.

A Universidade de Uberaba, cujos recursos financeiros e infraestrutura permitiram a execução deste projeto.

À CAPES-PROSUP pela concessão da bolsa de estudo.

À FAPEMIG- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (APQ 01203-23) e a CAPES-PDPG 3/4- Programa de Desenvolvimento da Pós-graduação (PDPG) Emergencial de Consolidação Estratégica dos Programas de Pós-graduação (PPGs) stricto sensu acadêmicos notas 3 e 4 pelo suporte financeiro.

À BotuPharma e à Dra. Raquel Puelker pelo fornecimento dos meios necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Marcos Vinicius da Silva, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), por gentilmente permitir o uso do microscópio de epifluorescência para as avaliações deste experimento.

Ao Prof. Dr. Ian Martin, meu orientador, por me dar voz e aceitar o desafio de realizar o experimento na área que eu tanto almejava e por mover mundos e fundos para que o laboratório funcionasse! Se não fosse você, que acreditou em mim, eu não estaria onde estou hoje.

À Profa. Dra. Joely Ferreira Figueiredo Bittar, por toda a paciência, ensinamentos e confiança.

Ao Prof. Dr. Endrigo Gabellini Leonel Alves, por sempre se disponibilizar para ajudar no que fosse necessário.

À Profa. Dra. Dunia Ibrahim Campos e ao frigorífico Boi Bravo, pelo valioso apoio e suporte no fornecimento dos oócitos utilizados na condução deste experimento.

Ao Prof. Dr. Renato Bortocan, do curso de Farmácia, por todo o suporte no desenvolvimento do extrato do presente estudo.

Aos professores da pós-graduação Isabel Rodrigues Rosado, Renato Linhares Sampaio, André Belico e Maurício Scoton Igarasi, por compartilharem seu conhecimento.

Às minhas amigas de mestrado, Lara Bernardes Bizinoto, Fernanda Oliveira Soares e Giovanna Rodrigues Goulart, que estiveram presentes para apoiar e tornar momentos tensos mais leves.

Aos “meus” alunos de Iniciação Científica João Victor de Jesus Franco, Júlia Araujo e Matheus Bazaga, por todo carinho, paciência, ajuda, momentos de risadas e desabafos. Vocês são ótimos e vão trilhar um caminho brilhante.

Às secretárias da pós-graduação, Lanamara e Flávia, por toda gentileza e troca que tivemos ao longo dos últimos anos.

Aos amigos do laboratório de Clínica e Patologia Animal Maritssa, Ana Carolina, Marília, Lincoln, Eliane, Evelyn e Cristina por compartilhar tantos momentos incríveis e desesperadores. Vocês são especiais e sempre vou recordar com carinho de vocês.

À equipe responsável pela esterilização, Rose e Stella, minha gratidão por sempre se colocarem à disposição para organizar meus materiais com tanto carinho e agilidade.

Minha mais singela gratidão e admiração à embriologista Letícia Schefer, que sempre se colocou à disposição para responder todas as minhas dúvidas e me ajudar no que fosse necessário para que eu pudesse executar meu experimento.

À equipe da Trans Ova Genetics de Richland-WA, Janessa, Alexa, Tony, Patti, Kenzie, Sophia, Katelyn e Bailey, por me apoiarem e permitirem que eu escrevesse grande parte dessa dissertação em meu ambiente de trabalho. A colaboração de vocês foi fundamental para que eu pudesse finalizar este projeto tão importante para mim.

Aos meus pais, Andréia e Carlos, e a minha irmã, Karla, meu eterno agradecimento por todo o apoio, amor e dedicação que sempre me deram. Sem o respaldo incondicional de vocês, tanto nos momentos de conquistas quanto nos desafios, eu não teria chegado até aqui. Sempre acreditaram em mim e nos meus sonhos. Cada palavra de encorajamento e cada gesto de carinho foram essenciais para que eu pudesse seguir firme em minha jornada.

Aos meus sogros, Cristiana e Anderson, meu sincero reconhecimento pela confiança e pelo apoio. Obrigada por me acolherem como filha de vocês, com tanto carinho desde o início e por sempre acreditarem em mim. O incentivo de vocês foi vital, especialmente nos momentos em que precisei de forças para seguir adiante.

À minha avó Fátima, por sempre rezar por mim e fornecer palavras de afeto e conforto.

Aos meus melhores e mais antigos amigos, Bárbara e Felipe, por estarem presentes em todos os momentos, me apoiarem incondicionalmente e sempre acreditarem nas minhas loucuras. Vocês são meus irmãos de alma!

Às minhas amigas Luana e Nanda, por sempre acreditarem em mim e depositarem tanta confiança no meu potencial. E aos amigos que fiz ao iniciar essa nova jornada – Gabriela, Vinicius, Felipe, Caroline, Mariana, Matheus, Aline e Fábio –, por me ouvirem falar sobre minha dissertação por meses a fio e compreenderem minhas ausências em prol dessa conquista. Vocês sempre foram gentis, me apoiaram e me encorajaram, e sou imensamente grata por isso.

E, de maneira grandiosa, minha eterna gratidão ao meu marido, Anderson Vinhais. Você é, sem dúvida, a pessoa que mais acredita no meu potencial e que sempre esteve ao meu lado, com amor incondicional, em cada passo dessa jornada. Sua paciência, apoio e dedicação foram fundamentais para que eu pudesse alcançar este momento. Você viu em mim qualidades que eu mesma não conseguia enxergar e, com sua força e coragem, me ensinou a seguir adiante mesmo nos momentos de maior desafio. Cada sacrifício que fez para que eu pudesse me concentrar nesse trabalho, cada gesto de amor, cada palavra de incentivo, se tornaram a base sólida sobre a qual construí esta conquista. Você é meu maior apoio, meu porto seguro e a razão de muitas das minhas forças. Junto de nossa filha, Manuela, vocês são meu maior tesouro e o maior sentido da minha vida. Agradeço profundamente por compartilhar comigo não apenas as alegrias e as conquistas, mas também as dificuldades, me ensinando, dia após dia, sobre o verdadeiro significado de paciência, resiliência e amor incondicional. Eu sou imensamente grata por absolutamente tudo que faz por nós e amo vocês mais do que palavras podem expressar!

APOIO FINANCEIRO

Esse estudo foi desenvolvido com apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação (PDPG) Emergencial de Consolidação Estratégica dos Programas de Pós-Graduação (PPGs) *stricto sensu* acadêmicos (CAPES-PDPG 3-4) e Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (CAPES-PROSUP); Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – PIBIC-CNPq; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG – PIBIC e APQ 01203-23) e Universidade de Uberaba – Programa de Apoio à Pesquisa (PAPE-Uniube). Os autores são gratos às Instituições mencionadas acima que tornaram este estudo possível.

RESUMO

A presente dissertação está estruturada em dois capítulos. O primeiro tem como objetivo realizar uma revisão abrangente da literatura sobre a Maturação *In Vitro* de Oócitos Bovinos, intitulado “*In vitro* maturation of bovine oocytes: The role of ROS, oxidative stress, and the impact of natural antioxidant supplementation - Maturação *in vitro* de oócitos bovinos: O papel das EROS, estresse oxidativo e a suplementação com antioxidantes naturais”. Este capítulo foi publicado na revista “Concilium” (DOI: <https://doi.org/10.53660/CLM-4249-24U19>, ISSN: 0010-5236) e discute o crescimento da produção *in vitro* de embriões (PIVE) no Brasil, enfatizando a importância da fase de maturação *in vitro* para o sucesso desse processo. O segundo capítulo dedica-se ao uso do extrato de *Moringa oleifera*, em diferentes concentrações, nos meios de maturação *in vitro*, investigando sua influência na maturação nuclear e citoplasmática de oócitos bovinos. Adicionalmente, foram avaliados os efeitos desse antioxidante sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e os níveis de EROS. Os resultados sugerem que a *Moringa oleifera*, na concentração de 50 µg/mL, promove a maturação nuclear dos oócitos, preserva a viabilidade das células do *cumulus*, reduz os níveis de EROS e melhora a função mitocondrial.

Palavras-chave: antioxidantes, moringa oleífera, maturação *in vitro*, estresse oxidativo, oócitos bovinos

ABSTRACT

This dissertation is structured into two chapters. The first aims to provide a comprehensive review of the literature on In Vitro Maturation of Bovine Oocytes, entitled “In vitro maturation of bovine oocytes: The role of ROS, oxidative stress, and the impact of natural antioxidant supplementation.” This chapter was published in the journal “Concilium” (DOI: <https://doi.org/10.53660/CLM-4249-24U19>, ISSN: 0010-5236) and discusses the growth of in vitro embryo production (IVP) in Brazil, emphasizing the importance of the in vitro maturation phase for the success of this process. The second chapter focuses on the use of hydroalcoholic extract of *Moringa oleifera*, in different concentrations, in in vitro maturation media, investigating its influence on the nuclear and cytoplasmic maturation of bovine oocytes. Additionally, the effects of this antioxidant on mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) and ROS levels were assessed. The results suggest that *Moringa oleifera*, at a concentration of 50 $\mu\text{g/mL}$, promotes nuclear maturation of oocytes, preserves the viability of cumulus cells, reduces ROS levels, and improves mitochondrial function.

Keywords: antioxidants, *Moringa oleifera*, in vitro maturation, oxidative stress, bovine oocytes

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Imagem das folhas de *Moringa oleifera* dispostas sobre bancada coberta com toalha. As folhas foram reviradas 3 vezes ao dia para que ambos os lados secassem por completo e para que não houvesse proliferação de microrganismos. Tal procedimento foi realizado por 7 dias.....45
- Figura 2.** Preparação do pó das folhas de *Moringa Oleífera* para produção do extrato hidroalcóolico, no Laboratório de Farmacologia da Universidade de Uberaba (Uniube). **A.** Folhas secas prontas para o processo de maceração. **B.** Maceração das folhas realizada em um gral com auxílio de um pistilo. **C.** Após maceração, o pó foi peneirado sucessivamente nas malhas de tamis 10 e 20. **D.** Pó resultante da maceração e peneiragem das folhas de *Moringa oleifera*, finalizado e pronto para produção do extrato hidroalcóolico.....45
- Figura 3.** Obtenção do extrato hidroalcóolico das folhas de *Moringa Oleífera*, no Laboratório de Farmacologia da Universidade de Uberaba (Uniube). **A.** Notar conteúdo presente no Erlenmeyer contendo 20 gramas do pó das folhas de *Moringa Oleifera*, 100 mL de água destilada e 100 mL de etanol a 95%, obtendo-se a concentração de 10%, após 48 horas de agitação. **B.** Preparação da bomba à vácuo juntamente com sistema de filtração e funil de Büchner com papel filtro sobre um Kitassato. **C.** Início da filtração à vácuo, depositando-se o conteúdo agitado por 48 horas no funil de Büchner com papel filtro. **D.** Notar massa seca restante após a finalização da filtração à vácuo. **E.** Extrato hidroalcóolico líquido obtido após filtração a vácuo. **F.** Becker contendo o extrato hidroalcóolico líquido que foi mantido em estufa com temperatura controlada a 50 °C até evaporação completa do solvente. **G.** Após 15 dias, a evaporação completa do solvente resultando em uma massa firme do extrato. **H.** Maceração da massa firme do extrato seco em um gral com auxílio do pistilo para obtenção do extrato em pó. **I.** Armazenamento do extrato seco em pó em um pote de vidro estéril.....47
- Figura 4.** Preparação dos ovários bovinos para punção folicular após a coleta que foi realizada no frigorífico abatedouro Boi Bravo, situado no município de Uberaba-MG. **A.** Ovários lavados em NaCl 0,9%, previamente aquecida entre 35 e 38 °C, até ficarem com aspecto translúcido.

B. Ovários imersos em solução de NaCl 0,9%, e mantidos em banho maria entre 35 e 38 °C até momento da aspiração folicular.....48

Figura 5. Ovário bovino, coletado no frigorífico abatedouro Boi Bravo, situado no município de Uberaba-MG. Observar folículos ovarianos de diversos diâmetros (setas pretas). Apenas aqueles entre 2 e 8 mm foram aspirados.....49

Figura 6. Aspiração folicular de oócitos provenientes de ovários bovinos coletados em frigorífico abatedouro Boi Bravo, situado no município de Uberaba-MG. **A.** Os folículos entre 2 e 8 mm, foram aspirados com auxílio de uma agulha 30 x 8 mm e uma seringa de 10 mL. **B.** Notar que o líquido folicular foi cuidadosamente depositado na parede de um tubo Falcon de 50 mL. **C.** Após 10 minutos de repouso com o tubo Falcon em posição vertical, mantido em banho maria a 37 °C, notar a formação de um *pellet* no fundo do tubo (região circundada em vermelho)49

Figura 7. Filtragem do *pellet* para seleção dos oócitos após aspiração folicular de ovários provenientes de frigorífico abatedouro localizado em Uberaba-MG. **A.** Após a formação do *pellet*, este foi cuidadosamente pipetado em um mini filtro para oócitos. Observe o mini filtro sobre um tubo Falcon de 50 mL contendo o conteúdo pipetado (seta preta). **B.** Momento em que o *pellet* contendo os oócitos foi filtrado (setas pretas) **C.** Imagem obtida após filtragem do *pellet*. Nota-se no fundo do mini filtro o conteúdo que foi filtrado, pronto para ser utilizado (setas pretas). **D.** Placa de Petri previamente preparada, de 100 x 20 mm, para receber o fluido contendo os oócitos que foi filtrado, invertido e lavado sobre a placa para o rastreamento subsequente.....50

Figura 8. Imagem, em aumento de 40x, de oócitos bovinos após seleção e classificação. Considerando que apenas aqueles selecionados e classificados como Grau 1 (exemplificados pelas setas vermelhas) e Grau 2 (exemplificados pelas setas amarelas) prosseguiram para a etapa de maturação *in vitro* (MIV).....51

Figura 9. Placa de Petri de 60 mm contendo 4 gotas de 100 µL de PBS (indicadas pelas setas vermelhas) e 4 gotas de 100 µL de BotuFIV Oocyte Wash® (indicadas pelas setas pretas). As gotas de PBS foram usadas para seleção dos oócitos, enquanto as de BotuFIV Oocyte Wash® foram destinadas à remoção do excesso de debríss celulares.....52

Figura 10. Placa de Petri de 30 mm com gotas de 100 µL contendo seus respectivos tratamentos (M0, M50, M100, M150 e VITC). **A.** Placa de Petri preparada com duas horas de antecedência para permitir a estabilização do pH do meio BotuFIV IVM®, juntamente com seus respectivos tratamentos, em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. **B.** Notar meio já estabilizado contendo os oócitos divididos entre os cinco grupos, prontos para a MIV em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, por 22 horas.....53

Figura 11. Microscopia de epifluorescência demonstrando avaliação da maturação nuclear de oócitos bovinos provenientes de ovários de frigorífico abatedouro, por meio de marcação com Hoechst, após 22 horas de MIV **A.** Oócio imaturo em estágio de vesícula germinativa. **B.** Oócio maduro em metáfase II, evidenciando o núcleo (seta vermelha) e a extrusão do 1º corpúsculo polar (seta amarela). Aumento 40x.....57

Figura 12. Imagens fluorescentes de oócitos bovinos provenientes de ovários de frigorífico abatedouro, corados com MitoTracker Red® após 22 horas de maturação *in vitro*. A distribuição mitocondrial foi avaliada em diferentes grupos tratados com antioxidantes, *Moringa oleifera* (50, 100 e 150 µg/mL) e da vitamina C (50µg/mL). As imagens ilustram: **A.** Mitocôndrias com distribuição periférica; **B.** Mitocôndrias em transição; **C.** Mitocôndrias dispersas pelo citoplasma.....58

Figura 13. Intensidade de fluorescência de espécies reativas de oxigênio (EROs) e potenciais de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em oócitos bovinos provenientes de ovários de frigorífico abatedouro após 22 horas de maturação *in vitro* na presença de *Moringa oleifera* (50, 100 e 150 µg/mL) e de vitamina C (50µg/mL). **A.** Oócitos marcados com MitoTracker Red® para quantificação do $\Delta\Psi_m$. M0 ($n = 158$); M50 ($n = 165$); M100 ($n = 159$); M150 ($n = 168$); VITC ($n = 170$). **B.** Imagens fluorescentes representativas de oócitos marcados com H2DCFDA para quantificação de EROS. M0 ($n = 163$); M50 ($n = 155$); M100 ($n = 165$); M150 ($n = 176$); VITC ($n = 195$). **C.** Quantificação da intensidade de fluorescência relativa ao $\Delta\Psi_m$. **D.** Quantificação da intensidade de fluorescência relativa a EROS. As figuras expressão a média da intensidade de pixels ± EP. Letras diferentes nas colunas evidenciam diferenças significativas ($p < 0,001$; Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn)59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos oócitos bovinos segundo as características dos complexos <i>cumulus oophorus</i> (CCOs) e citoplasma, de acordo com a metodologia de Gonçalves et al. (2008)	51
Tabela 2. Preparação, diluição do estoque e obtenção da concentração final dos antioxidantes para adição nos meios de MIV contendo oócitos bovinos provenientes de ovários coletados em um frigorífico abatedouro em Uberaba-MG.....	52
Tabela 3. Influência da <i>Moringa oleífera</i> após 22 horas de maturação in vitro, oócitos bovinos provenientes de ovários de frigorífico abatedouro analisados quanto à expansão dos CCOs por inspeção visual, viabilidade celular do cumulus por coloração com <i>Trypan blue</i> e maturação nuclear por marcação com Hoechst (média ± EP)	57
Tabela 4. Efeito da <i>Moringa oleífera</i> na maturação citoplasmática de oócitos bovinos provenientes ovários de frigorífico abatedouro. Os oócitos, após 22 horas de maturação in vitro, foram quanto à distribuição mitocondrial e seus padrões, utilizando MitoTracker Red® (média ± EP), controle positivo (VITC) e negativo (sem antioxidante)	58

LISTA DE ANEXOS

Anexo I: Comitê de Ética em Experimentação Animal.....	70
--	----

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AI- Anáfase I

ATP – Trifosfato de Adenosina

BM- Banho maria

BHT- Butil-hidroxitolueno

BSA- Albumina Sérica Bovina

CAT- Catalase

Ca²⁺- Íon cálcio

CCO's- Células do *cumulus oophorus*

CO₂: Dióxido de carbono

CP- Corpúsculo polar

CIV- Cultivo *in vitro*

DMSO- Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido desoxirribonucleico

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EROs- Espécies Reativas de Oxigênio

EP- Erro Padrão

FIV- Fertilização *in vitro*

GSH- Glutationa

H₂DCFDA- Diclorofluoresceína

H₂O₂- Peróxido de Hidrogênio

HVU- Hospital Veterinário da Uniube

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IETS- Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

M0- Grupo controle, sem antioxidantes

M50- Extrato hidroalcóolico de *Moringa oleifera* na concentração 50 µg/mL

M100- Extrato hidroalcóolico de *Moringa oleifera* na concentração 100 µg/mL

M150- Extrato hidroalcóolico de *Moringa oleifera* na concentração 150 µg/mL

MI- Metáfase I

MII- Metáfase II

MIV- Maturação *in vitro*

MPF- Fator promotor da fase M

NaCL- Cloreto de sódio

O₂- Oxigênio

O₂•- Ânios superóxido

•OH- Radicais hidroxila

OPU- Ovum Pick Up

OXPHOS- Fosforilação Oxidativa

PBS- Tampão fosfato salino

PIVE- Produção *in vitro* de embriões

QVG- Quebra da vesícula germinativa

RNA- Ácido Ribonucleico

RNAm- Ácido Ribonucleico mensageiro

SFB- Soro Fetal Bovino

SOD- Superóxido dismutase

TI- Telófase I

UNIUBE- Universidade de Uberaba

UFTM- Universidade Federal do Triângulo Mineiro

VG- Vesícula Germinativa

VITC- Vitaminca C

$\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos: O papel das EROs, estresse oxidativo e a suplementação com antioxidantes naturais	21
INTRODUÇÃO.....	22
REVISÃO DE LITERATURA	25
<i>Maturação oocitária</i>	25
<i>Maturação nuclear</i>	25
<i>Maturação citoplasmática</i>	25
<i>Reações de oxidação-redução (redox), produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estresse oxidativo (EO)</i>	27
<i>Efeito da adição de antioxidantes em meios de cultivo in vitro</i>	29
<i>Moringa oleifera</i>	30
CONCLUSÕES	31
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 2: Suplementação com diferentes concentrações do extrato de <i>Moringa oleifera</i> em meios de maturação <i>in vitro</i> de oócitos bovinos.....	41
INTRODUÇÃO.....	42
MATERIAL E MÉTODOS.....	44
<i>Preparo do extrato da Moringa oleifera</i>	44
<i>Coleta dos ovários e punção folicular</i>	48
<i>Seleção dos oócitos e Maturação in vitro</i>	50
<i>Experimento I: Avaliação das células do cumulus e da maturação nuclear</i>	53
<i>Experimento II: Maturação citoplasmática e avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)</i>	54
<i>Experimento III: Quantificação dos níveis de EROs intracelular pelo ensaio de diclorofluoresceína</i>	55
ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
RESULTADOS.....	56

<i>Experimento I: Efeitos da Moringa oleifera na expansão e na viabilidade das células do cumulus e na maturação nuclear de oócitos bovinos.....</i>	56
<i>Experimento II: Efeitos da Moringa oleifera na maturação citoplasmática de oócitos bovinos por meio da avaliação de distribuição mitocondrial e nos níveis de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em oócitos bovinos.....</i>	57
<i>Experimento III: Efeito da Moringa oleifera nos níveis EROs intracelular em oócitos bovinos.....</i>	58
DISCUSSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXO.....	70

Capítulo 1

In vitro maturation of bovine oocytes: The role of ROS, oxidative stress, and the impact of natural antioxidant supplementation

Maturação *in vitro* de oócitos bovinos: O papel das EROs, estresse oxidativo e a suplementação com antioxidantes naturais

Received: 30-08-2024 | Accepted: 01-10-2024 | Published: 05-10-2024

Mylena Martins Coelho-Vinhais

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1771-8153>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos - Universidade de Uberaba, Brasil

E-mail: mylenamartins97@gmail.com

Anderson Vinhais Alves Filho

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-2154-1718>

Médico Veterinário Autônomo, Brasil

E-mail: andersonvinhais@gmail.com

Isabel Rodrigues Rosado

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7819-4253>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos - Universidade de Uberaba, Brasil

E-mail: isabel.rosado@uniube.br

Joely Ferreira Figueiredo Bittar

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1813-9006>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos - Universidade de Uberaba, Brasil

E-mail: joely.bittar@uniube.br

Eustáquio Resende Bittar

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7176-9920>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos - Universidade de Uberaba, Brasil

E-mail: eustaquio.bittar@uniube.br

Endrigo Gabellini Leonel Alves

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8524-3949>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos - Universidade de Uberaba, Brasil

E-mail: endrigoglalves@gmail.com

Ian Martin

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6934-8257>

Programa de Pós-Graduação em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos - Universidade de Uberaba, Brasil

E-mail: ian.martin@uniube.br

ABSTRACT

According to available data in the literature, Brazil has one of the largest cattle herds in the world and is one of the leading embryo producers, with a clear predominance of embryos produced *in vitro*. These data influence the ongoing pursuit of optimizing the results obtained in IVEP (*in vitro* embryo production). In this technique, *in vitro* maturation (IVM) is such a crucial stage that it justifies studies involving components that, when added to the media, can lead to improved cleavage rates and blastocyst development. It is well known that oocyte quality is influenced by oxidative stress, and in this context, the inclusion of antioxidants in the IVM medium may enhance these outcomes. Thus, the present study aimed to review oocyte maturation, the impact of oxidative stress, and the addition of antioxidants, such as *Moringa oleifera*, to the IVM media.

Keywords: Reactive Oxygen Species; *In vitro* embryo production; Oocyte nuclear maturation; Oocyte cytoplasmic maturation; *Moringa oleifera*.

RESUMO

De acordo com os dados disponíveis na literatura, o Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos do mundo e é um dos principais produtores de embrião, com uma clara predominância dos embriões produzidos *in vitro*. Tais dados influenciam a constante busca pela otimização dos resultados obtidos na PIVE (produção *in vitro* de embriões). Nesta técnica, a maturação *in vitro* (MIV) é uma etapa de tamanha relevância que justifica estudos com componentes que quando adicionados aos meios possam levar ao incremento na taxa de clivagem e na obtenção de blastocistos. Sabidamente a qualidade oocitária é influenciada pelo estresse oxidativo e, neste sentido, a inclusão de antioxidantes ao meio de MIV pode resultar em tal incremento. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo revisar a maturação oocitária, o impacto do estresse oxidativo e a adição de antioxidantes, como a *Moringa oleifera*, nos meios de MIV.

Palavras-chave: Espécies reativas ao oxigênio; produção *in vitro* de embriões; Maturação nuclear do oócito; Maturação citoplasmática do oócito; *Moringa oleifera*.

INTRODUÇÃO

Em 1978, na Inglaterra, após o nascimento do primeiro bebê concebido por meio de fertilização *in vitro* (FIV), intensificaram-se as pesquisas para o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas *in vitro*, voltadas para sua aplicação em bovinos (Steptoe & Edwards, 1978; Van Wagendonk-de Leeuw, 2006).

Em 1981, nos Estados Unidos, nasceu o primeiro bezerro de FIV. Para este feito, os oócitos maduros foram cirurgicamente obtidos dos ovários ou ovidutos de vacas. Esses oócitos foram então fertilizados e cultivados *in vitro*, sendo posteriormente transferidos com sucesso. Esse marco representou avanços significativos, impulsionando pesquisas mais aprofundadas e contribuindo para notáveis progressos na área (Brackett et al., 1982).

No Brasil, marcos significativos na reprodução *in vitro* incluem o primeiro bezerro produzido *in vitro* pelo Laboratório de Reprodução Animal da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em 1994 (Dode & Rumpf, 2002) e o estabelecimento do primeiro laboratório de produção *in vitro* de embriões (PIVE) em 1998 (Viana, 2008).

Durante as últimas décadas, o Brasil vivenciou um aumento notável no tamanho do rebanho bovino, sendo o segundo maior rebanho mundial de bovinos, contando com 234,3 milhões de cabeças (IBGE, 2022). A quantidade de animais e a importância dos mesmos para a economia do país exige uma grande demanda de biotecnologias reprodutivas e uma dessas biotecnologias em ascensão é a PIVE e, desde então, esta técnica tem experimentado uma crescente implementação por parte dos pecuaristas, tornando-se uma prática cada vez mais corriqueira na reprodução de bovinos (Varago et al., 2008; Ferré et al., 2020).

A PIVE possui potencial significativo para aprimorar consideravelmente o desempenho reprodutivo dos rebanhos bovinos, resultando na geração de animais zootecnicamente superiores. Além disso, contribui para acelerar o progresso genético e reduzir os intervalos entre

as gerações (Varago et al., 2008; Baruselli et al., 2019; Magata et al., 2019). Tal tecnologia amadureceu a uma escala semelhante à observada na fertilização *in vitro* humana e é provável que persista e seja aprimorada no decorrer das próximas décadas (Sirard, 2018).

Conforme relatado pela Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (International Embryo Transfer Society - IETS, 2022), houve um notável aumento, de 25,6%, no número de embriões produzidos *in vitro* em escala global em comparação ao ano de 2020. O líder mundial em produção de embriões *in vitro* é os Estados Unidos, seguido pelo Brasil. Entretanto, vale ressaltar que os números do Brasil, provavelmente, são subestimados, uma vez que se nota uma diferença evidente entre o número de embriões reportados às associações de criadores e o número de embriões vendidos (IETS, 2022).

Para a realização da PIVE, é necessário a execução de quatro etapas, sendo elas: obtenção de oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) (Varago et al., 2008, Maillo et al., 2016). A técnica predominante para a obtenção de oócitos é a aspiração dos folículos *in vivo*, conhecida como OPU (Ovum Pick Up). Em contrapartida, a punção folicular *post mortem*, realizada em ovários provenientes de animais de abatedouros ou de óbitos súbitos, é comumente empregada em casos de projetos de pesquisa ou em animais de alto valor genético (Ahumada et al., 2012).

Entre as etapas mencionada, destaca-se a MIV, considerada crucial, devido a uma série de modificações estruturais e bioquímicas que ocorrem no núcleo e no citoplasma do oóbito. Esse processo torna o gameta feminino apto, influenciando diretamente na FIV e no subsequente desenvolvimento embrionário (CIV) (Ferreira et al., 2009).

A qualidade intrínseca do oóbito é um dos principais fatores que impactam a eficiência embrionária. O oóbito desempenha um papel crucial ao fornecer componentes essenciais para o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Esses componentes são produzidos por meio de eventos moleculares que preparam o oóbito, conferindo-lhe a capacidade de retomar a totipotência após a FIV (Rizos et al., 2002; Denicol & Siqueira, 2023).

Um dos fatores que pode afetar consideravelmente a qualidade oocitária é o estresse oxidativo, acarretando o baixo desempenho não apenas na MIV, mas também nas demais fases (Turrens, 2003; Catala et al., 2018; Lin & Wang, 2020; Soto-Hera & Paramio, 2020). O estresse oxidativo é ocasionado por condições que causam desequilíbrio entre a quantidades de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a capacidade antioxidante da célula, que pode surgir devido à exposição à luz, excesso de manipulação, falta de antioxidantes nos meios de cultura, variações na tensão de oxigênio, seja ela baixa ou alta, pH e temperatura, e a capacidade da célula de neutralizar o seu efeito (Guemra et al., 2013; Lin & Wang, 2020; Soto-Hera & Paramio, 2020).

Evidências favoráveis à suplementação com antioxidantes na PIVE estão se tornando cada vez mais prevalentes na literatura (Chen et al., 2018; Khan et al., 2018; Lee et al., 2019; Oliveria et al., 2022). Estudos experimentais têm elucidado os efeitos dos antioxidantes *in vitro*, permitindo a definição de suas concentrações e eficácia (Budani & Tiboni, 2020).

Considerando esse contexto, é de suma importância a condução de mais pesquisas que explorem o uso de antioxidantes, visando aprimorar a técnica e aumentar o sucesso dos procedimentos. Em particular, o uso de antioxidantes naturais tem ganhado destaque como uma abordagem promissora para atenuar os efeitos causados pelas EROs. Essas alternativas são viáveis, de baixo custo e que têm demonstrado resultados promissores (Sovernigo et al., 2017; Santos et al., 2018; Santos et al., 2019; Oliveira et al., 2022).

Contudo, a aplicação efetiva de antioxidantes naturais enfrenta desafios significativos, que incluem a necessidade de resultados benéficos com comprovação de eficácia. A efetividade desses antioxidantes está intrinsecamente ligada à capacidade de atenuar as EROs, sendo influenciada por fatores como a determinação da concentração apropriada, a obtenção do extrato, bem como a origem da planta e sua composição de acordo com a estação (Santos et al., 2018). Esses fatores tornam a reprodução consistente dos resultados mais complexa.

A vitamina C e diversas outras substâncias naturais apresentam potencial para desempenhar o papel de antioxidantes em meios de maturação. Um exemplo é a *Moringa oleifera*, uma planta originária da Índia (Leone et al., 2016). Esta planta é reconhecida por possuir diversas substâncias farmacológicas valiosas, tais como propriedades antidiabéticas, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antioxidantes, cicatrizantes, entre outras (Paikra et al., 2017; Sovernigo et al., 2017).

Devido às suas abrangentes propriedades benéficas, a *Moringa oleifera* tem sido alvo de crescente investigação, destacando-se pelo seu potencial como uma fonte natural de antioxidantes (Sharma et al., 2011; Leone et al., 2016; Sultana et al., 2020). A notável atividade antioxidante dessa planta é atribuída à presença de flavonoides e compostos fenólicos em suas folhas, os quais demonstram a capacidade de neutralizar eficazmente os radicais livres gerados durante o estresse oxidativo (Liu et al., 2018).

Diante desse cenário, a realização de estudos que explorem o emprego da *Moringa oleifera* em ambientes de MIV, com foco na redução das EROs e na melhoria na etapa de MIV da PIVE de bovinos, torna-se de suma importância. Isso se justifica pela escassez de pesquisas que abordem os reais efeitos do extrato de *Moringa oleifera* em experimentos realizados *in vitro* na área de biotecnologia reprodutiva animal.

OBJETIVO

Este estudo teve como objetivo revisar a literatura no que diz respeito a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos, bem como o impacto das espécies reativas de oxigênio (EROs) que podem estar presentes no decorrer da produção *in vitro* de embriões bovinos e, por fim, compreender como a utilização de antioxidantes naturais em meios MIV podem reduzir os efeitos deletérios dos EROS.

REVISÃO DE LITERATURA

MATURAÇÃO OOCITÁRIA

O processo de maturação dos oócitos permite que as células adquiram gradualmente a capacidade intrínseca de avançar em seu desenvolvimento (Ferreira et al., 2009). Esse processo é conhecido por envolver mecanismos complexos, que abrangem tanto o núcleo quanto o citoplasma, demandando uma sincronização no decorrer da maturação (Shu et al., 2008).

MATURAÇÃO NUCLEAR

A maturação nuclear envolve uma série de eventos e bloqueios cruciais que ocorrem durante a meiose. Inicialmente, *in vivo*, ocorre a retomada da meiose a partir do estágio de diplóteno pelo estímulo gonadotrófico, em que há a condensação cromossômica e a quebra da vesícula germinativa (QVG), marcando a reversão do primeiro bloqueio meiótico. Conforme o oócito avança pelas diferentes etapas da divisão celular, metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), ele alcança a metáfase II (MII), quando ocorre o segundo bloqueio meiótico. Em síntese, a maturação nuclear é caracterizada pela reversão do primeiro bloqueio meiótico, que corresponde desde o estágio de vesícula germinativa (VG) até o segundo bloqueio na metáfase II (MII) (Kubelka et al, 2000; Trounson et al., 2001).

MATURAÇÃO CITOPLASMÁTICA

A maturação citoplasmática compreende uma gama de processos e alterações necessárias para que o oócito torne-se apto para fecundação e mantenha um posterior desenvolvimento embrionário inicial (Anguita et al., 2007; Watson, 2007). Durante esses processos, ocorrem mudanças ultraestruturais e moleculares, que vão do estágio de VG até o fim da MII (Landim- Alvarenga & Maziero, 2014). Essas mudanças incluem, o acúmulo de proteínas e RNA, desenvolvimento de mecanismos reguladores de cálcio, redistribuição de organelas, entre outros (Krisher, 2004; Anguita et al., 2007).

Além disso, existem alguns parâmetros indiretos que podem ser considerados na avaliação da maturação citoplasmática. Por exemplo, um oócito maduro que demonstra capacidade de clivagem e desenvolvimento em blastocisto após fertilização ou ativação partenogenética é indicativo de um citoplasma maduro (Landim- Alvarenga & Maziero, 2014). Outros parâmetros indiretos incluem a expansão das células do *cumulus oophuros* (CCO's) e a extrusão do primeiro corpúsculo polar (CP) (Kruip et al., 1983).

No que comprehende as modificações ultraestruturais, observa-se uma reorganização das organelas citoplasmáticas. Essa reestruturação ocorre por meio dos microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto, e o reposicionamento de cada organela é determinado pela necessidade da célula ao longo de cada estágio de desenvolvimento. Como resultado, mitocôndrias, grânulos corticais, retículo endoplasmático, complexo de golgi e ribossomos adotam diferentes posições em relação às observadas no momento em que a célula se encontra em VG (Hyttel et al., 1986; Fair et al., 1995; Dumollard et al., 2007).

As mitocôndrias, por exemplo, inicialmente localizadas na periferia do oócito imaturo, movem-se para uma distribuição mais dispersa por todo o citoplasma. Estas desempenham um papel de suma importância no desenvolvimento dos oócitos, fornecendo energia na forma de ATP durante a maturação. Tanto a quantidade quanto a capacidade funcional dessas organelas são fatores cruciais para a fertilização e para o desenvolvimento embrionário (Hyttel et al., 1986; Santos et al., 2006; Blerkom, 2011).

O ATP sintetizado pelas mitocôndrias é essencial na síntese e fosforilação de proteína, sendo indispensável para a maturação citoplasmática, visto que impulsiona todos os processos que demandam energia, regula o tempo do ciclo celular e influencia a aquisição de competência de desenvolvimento. Em outras palavras, oócitos com baixa competência de desenvolvimento demonstram redução do metabolismo energético, resultando em atrasos fisiológicos no desenvolvimento subsequente. Consequentemente, embriões com menos ATP no citoplasma desenvolvem-se mais lentamente e com menor número de células (Liu et al., 2000; Ge et al., 2012; Lee et al., 2014; Leoni et al., 2015).

No que diz respeito ao processo de maturação molecular, engloba várias etapas, incluindo a transcrição, armazenamento e processamento de RNA (ácido ribonucleico mensageiro). Este processo culmina na síntese de proteínas pelos ribossomos que são essenciais para a maturação citoplasmática molecular. As proteínas produzidas desempenham papéis importantes na maturação, fertilização, formação dos pró-núcleos e desenvolvimento embrionário inicial (Fulka et al., 1998., Tomek et al., 2002; Tripathi et al., 2010).

Sabe-se que a maior parte do RNAm presente no oócito é produzida e armazenada no decorrer da foliculogênese. Quando a meiose é retomada, os cromossomos se tornam condensados e inativos. Portanto, até que ocorra a ativação da transcrição do DNA do embrião, a maturação do oócito, o zigoto e embriões com menos de 16 células dependem do RNAm e das reservas de proteínas armazenadas (Lonergan et al., 1997; Gandolfi & Gandolfi, 2001; Sirard et al., 2006).

REAÇÕES DE OXIDAÇÃO-REDUÇÃO (REDOX), PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) E ESTRESSE OXIDATIVO (EO)

As reações de oxidação-redução (redox) desempenham papéis benéficos e essenciais em diversos processos biológicos, incluindo a regulação da homeostase oxidativa, por meio da perda (oxidação) e do ganho (redução) de elétrons. Além de atuarem como sinalizadores celulares, em processos reprodutivos, por exemplo, as redox também podem agir como agentes oxidantes potencialmente prejudiciais (Barros et al., 2019; Aitken, 2020).

Durante o metabolismo celular, são gerados radicais livres como subproduto do metabolismo aeróbico, resultando na liberação de pró-oxidantes, como as espécies reativas de oxigênio (EROs). Estas incluem ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radicais hidroxila ($\cdot OH$) e peróxidos de hidrogênio (H_2O_2), entre outros. Embora o H_2O_2 não seja tecnicamente um radical livre, uma vez que não possui elétrons desemparelhados, ainda é considerado uma EROS (Agarwal et al., 2005; Wang et al., 2017).

As EROS desempenham papéis em vias complexas de sinalização envolvidas em diversas funções celulares e são encontradas em equilíbrio nas células em condições fisiológicas normais. Muitas das respostas mediadas pelas EROS atuam protegendo as células contra o estresse oxidativo e auxiliando no equilíbrio redox. Em níveis baixos, sua produção é até mesmo considerada de suma importância, visto que possuem funções no ambiente folicular, na maturação dos oócitos, agem como mediadoras no processo de fertilização e contribuem para o desenvolvimento embrionário inicial (Sabatini et al., 1999; Dröge, 2002; Romek et al.; 2017; Sovernigo et al., 2017; Lin & Wang, 2020).

Quando ocorre a superprodução de EROS em células, fluidos ou tecidos, há um desequilíbrio que ultrapassa a capacidade dos mecanismos antioxidantes intrínsecos de proteção e regulação, acarretando em um processo conhecido como estresse oxidativo. Sendo assim, o estresse oxidativo é desencadeado por moléculas ou compostos que oxidam substratos biológicos, levando à geração e superprodução de EROS, altamente danosas para a célula (Aitken, 2020).

O estresse oxidativo promove uma série de reações em várias moléculas, resultando em peroxidação lipídica, ruptura das membranas celulares, agregação e degradação de proteínas, além de danos ao DNA. Essas reações desencadeiam uma cascata de eventos que, por fim, levam à morte celular (Sovernigo et al, 2017; Catala et al., 2018).

Na PIVE, o estresse oxidativo representa um desafio significativo. Ele pode originar-se tanto de EROS endógenas, geradas pelo metabolismo celular normal, quanto de fontes exógenas, incluindo alta concentração de oxigênio (O_2), exposição à luz, variações de temperatura, pH, suplementos adicionados aos meios de cultura, manipulação dos oócitos, procedimentos de criopreservação e outros parâmetros físico-químicos que afetam o metabolismo celular como um todo (Turrens, 2003; Das et al., 2006; Lin & Wang, 2020).

Uma das principais fontes endógenas de estresse oxidativo decorre da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial. As mitocôndrias são organelas vitais que produzem trifosfato de adenosina (ATP) por meio de fosforilação oxidativa (OXPHOS). Durante esse processo, o piruvato e os ácidos graxos são oxidados pela cadeia de transporte de elétrons, levando à perda de elétrons que reagem diretamente com o oxigênio., formando ânions superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que serve como precursor para outras EROS e na propagação das reações da cadeia oxidativa, que induzem o estresse oxidativo. O desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes interrompe a sinalização redox, ou seja, com o desequilíbrio entre a produção de EROS e a capacidade da célula de neutralizá-las com antioxidantes, ocorre o estresse oxidativo, culminando em danos nos componentes celulares como lipídios, proteínas e DNA, como citado anteriormente (Turrens, 2003; Dumollard et al, 2007; Sies, 2015; Almansa-Ordonez et al., 2020).

Durante a maturação dos oócitos, a oxidação do piruvato para geração de ATP é acompanhada pela captação de O_2 e, consequentemente, pela produção de EROS. Em concentrações elevadas, essas EROS desencadeiam a desestabilização do fator promotor da fase M (MPF) e a redução dos fatores promotores de sobrevivência, resultando na apoptose mediada pela mitocôndria (Harris et al., 2009, Matos et al., 2009; Blerkom, 2011).

À vista disso, para assegurar a qualidade da produção *in vitro* de embriões (PIVE), é essencial que ocorra a homeostase oxidativa. Esse equilíbrio redox é considerado um fator crucial para o bom desempenho do processo e pode ser promovido por meio da adição de antioxidantes aos meios de MIV (Eini et al., 2018; Lin & Wang, 2020; Soto-Heras & Paramio, 2020).

EFEITO DA ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM MEIOS DE CULTIVO *IN VITRO*

Os antioxidantes atuam como “defensores” contra as EROS, neutralizando-as ou reduzindo sua produção, tornando-as inofensivas. Eles funcionam como agentes de manutenção redox, essenciais para minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo. Uma diversidade de antioxidantes pode ser adicionada aos meios de cultivo *in vitro* com intuito de reduzir esses danos (Goto et al., 1993; Sovernigo et al., 2017; Lee et al., 2019; Almubarak et al., 2023).

Os antioxidantes podem ser classificados em várias categorias. Entre os naturais endógenos enzimáticos estão a catalase (CAT), a glutationa peroxidase e a superóxido dismutase (SOD). Os naturais endógenos não enzimáticos incluem a glutatona, a melatonina e a ferritina, por exemplo. Já os antioxidantes naturais exógenos abrangem vitaminas, aminoácidos, carotenoides, ácidos graxos, polifenóis, dissacarídeos, entre outros. Além desses, existem os antioxidantes sintéticos, como a butil-hidroxitolueno (BHT), o propil galato, os tocoferóis e o ácido ascórbico (vitamina C). Esses compostos sintéticos são amplamente utilizados devido à sua eficácia e custo-benefício. No entanto, o uso excessivo está correlacionado à potenciais riscos à saúde, o que tem gerado em uma crescente demanda por alternativas naturais (Goto et al., 1993; Sovernigo et al., 2017; Lee et al., 2019; Rasheed & Azeez, 2019; Almubarak et al., 2023).

Na PIVE, a adição de antioxidantes aos meios de cultura atenua os impactos negativos das EROS nos óócitos durante a MIV e contribui para a melhoria do desempenho nas etapas seguintes (Rodrigues-Cunha et al., 2016; Eini et al., 2018; Santos et al., 2019).

Dentre os antioxidantes empregados em meios de cultivo, a vitamina C destaca-se pelos efeitos benéficos e custo-benefício em meios de MIV. Sua estrutura química permite que atue como doadora de elétrons, funcionando como agente redutor. Essa ação catalítica não apenas reduz, mas também neutraliza as EROS devido ao seu alto teor antioxidant e papel como cofator enzimático, desempenhando um papel crucial na proteção contra danos oxidativos (Wang et al., 2002; Belin et al., 2010; Khazaei & Aghaz, 2017).

Além da vitamina C, outros compostos antioxidantes exógenos, especialmente polifenóis como resveratrol, cisteamina, kaempferol, *Syzygium Aromatum*, quercetina, por exemplo, também demonstram eficácia. Esses antioxidantes têm a capacidade de transferir elétrons e radicais de hidrogênio, contribuindo para a proteção antioxidant nos processos de MIV (Wang et al., 2014; Sovernigo et al., 2017; Piras et al., 2018; Oliveira et al., 2022; Zhao et al., 2022). A vitamina C, particularmente, pode ser utilizada tanto em sua forma natural quanto sintética.

Estudos indicam que os antioxidantes naturais tendem a apresentar menores efeitos colaterais em comparação aos sintéticos, graças à maior estabilidade das estruturas moleculares e menor produção de resíduos tóxicos. Essas características são associadas a melhorias nas taxas de maturação, fertilização e formação de blastocistos (Dalvit et al., 2005; Chowdhury et al., 2017; Budani & Tiboni, 2020; Cajas et al., 2020; Aquino et al., 2023; Davoodian et al., 2024).

Um exemplo promissor de um antioxidante exógeno natural é aquele obtido a partir da planta *Moringa oleifera*. Esta foi amplamente estudada por suas propriedades nutricionais e medicinais, pois é rica em compostos antioxidantes, demonstrando benefícios significativos em contextos experimentais (Leone et al., 2015; Vats & Gupta, 2017).

Moringa oleifera

A *Moringa oleifera* (*M. oleifera*), uma árvore nativa da Índia e pertencente à família moringácea, tem ganhado destaque global devido à sua excepcional capacidade de adaptação a ambientes áridos, tropicais e subtropicais. Amplamente distribuída em regiões como América Central, do Norte e do Sul, Nepal, África, Filipinas, essa planta não apenas sobrevive, mas prospera, oferecendo uma abundante fonte de nutrientes essenciais. Suas diversas partes, incluindo folhas, sementes e raízes, são utilizadas há séculos não só como alimento, mas também por suas propriedades medicinais (Leone et al., 2016; Alegbeleye, 2018).

Os nutrientes essenciais dessa planta incluem zinco, magnésio, potássio, cálcio, ferro, enxofre, manganês, cobre (Valdez-Solana et al., 2015). Com o passar dos anos, seu uso tem se intensificado em virtude das suas propriedades antibacterianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, antifúngicas, anticarcinogênicas, antidiabéticas, dentre outras (Sugunabai et al., 2014; Aboulthana et al., 2021; Lalan et al., 2023; Segwati et al., 2023; Yang et al., 2023).

Todas as partes da *M. oleifera* são aproveitáveis para fins nutricionais e medicinais. As folhas, especialmente, destacam-se como uma fonte rica de carboidratos, ácidos graxos, vitaminas A, B, C, D e E, além de polifenóis como compostos fenólicos e flavonóides, taninos, saponinas, alcaloides, aminoácidos e minerais variados. Esses componentes permitem desempenhar um papel de suma importância na síntese e metabolismo enzimático, além de possuírem forte ação antioxidante (Tesfay et al., 2011; Leone et al., 2016; Liu et al., 2018).

Além disso, as vitaminas A (β - caroteno), C e E (α - tocoferol) são particularmente importantes no processo reprodutivo e na proteção antioxidante. Enquanto a vitamina A é essencial para proliferação celular e desenvolvimento embrionário, a vitamina C protege as membranas celulares e a vitamina E atua como antioxidante não enzimático, estabilizando o

estado redox e mitigando a produção de EROS (Vergara-Jimenez et al., 2017; Tiloke et al., 2018; Ajantha et al., 2018).

Os flavonoides presentes na *M. oleifera*, como quercetina, kaempferol, zeatina, catequina, isotiocianatos, rutina, sitosterol, campesterol, miricetina, contribuem significativamente para a prevenção de danos causados pelas EROS, atuando como doadores de átomos de hidrogênio e neutralizando os radicais livres (Procházková et al., 2011; Saini, et al., 2016; Vats & Gupta, 2017; Pollini et al., 2020).

A presença de compostos fenólicos na *Moringa oleifera* confere-lhe uma notável atividade antioxidante, estabilizando os radicais livres gerados pelas células por meio de doação e recebimento de elétrons, atuando assim como potentes moléculas antioxidantas. Esta ação é fundamental para neutralização dos radicais livres, protegendo as células contra os danos oxidativos (Wang et al., 2017; Rani et al., 2018).

CONCLUSÕES

Conclui-se que a produção de EROS durante o metabolismo celular ocorre de forma fisiológica e que em condições normais estes são combatidos pelos antioxidantes produzidos intrinsecamente pela célula, além disso, a produção de EROS em baixos níveis é considerada benéfica. Contudo, o aumento exacerbado na produção de EROS de forma que não possam ser combatidos pelos antioxidantes intrínsecos à célula, podem ocasionar danos celulares e acarretar atrasos ou falhas na maturação nuclear e/ou citoplasmática de oócitos durante a maturação *in vitro*. Neste sentido, o uso de antioxidantes é essencial para o incremento do processo de MIV, principalmente aqueles naturais, como a *Moringa oleifera*, que tendem a apresentar menores efeitos colaterais em comparação aos sintéticos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a FAPEMIG (PIBIC, PAPG e APQ 01203-23), PIBIC-CNPq, CAPES-Prosup, CAPES-PDPG 3/4 e PAPE-Uniube pelo auxílio financeiro que torna os nossos estudos possíveis.

REFERÊNCIAS

Aboulthana, WM; Shousha, WG; Essawy, EAR; Saleh, MH; Salama, AH. Assessment of the anti-cancer efficiency of silver *Moringa oleifera* leaves nano-extract against colon cancer induced chemically in rats. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.22, p. 3267-3286, 2021.

Aitken, RJ. Impact of oxidative stress on male and female germ cells: implications for fertility. **Reproduction**, v.159, p. 189-201, 2020.

Agarwal, A. Oxidative stress and its implications in female infertility- a clinician's perspective. **Reproductive BioMedicine Online**, v.11, n.5, p. 641-650, 2005.

Ahumada, CJ; Salvador, I; Cebrian-Serrano, A; Lopera, R; Silvestre, MA. Effect of supplementation of different growth factors in embryo culture medium with a small number of bovine embryos on *in vitro* embryo development and quality. **Animal**, v.7, n.3, p. 455-462, 2012.

Ajantha, A; Kathirvelan, C; Purushothaman, MR; Visha P. Study on nutrients, mineral and vitamin profile of *Moringa oleifera* leaf meal. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.7, n. 5, 2018.

Alegbeleye, OO. How functional in *Moringa oleifera*? A review of its nutritive, medicinal, and socioeconomic potential. **Food and Nutrition Bulletin**, v.39, n.1, 149-170, 2018.

Almansa-Ordonez, A; Bellido, R; Vanessa, R; Barragan, M; Zambelli, F. Oxidative stress in reproduction: a mitochondrial perspective. **Biology**, v.269, p. 1-22, 2020.

Almubarak, A; Yu, IJ; Jeon, Y. Antioxidants as alleviating agents of *in vitro* embryo production oxidative stress. **Journal of Animal Reproduction and Biotechnology**, v.38, p. 47-53, 2023.

Anguita, B; Jimenez-Macedo, AR; Izquierdo, D; Mogas, T; Paramio, MT. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepubertal goat oocytes. **Theriogenology**, v.67, p.526-536, 2007.

Aquino, LVA; Santos, MVO; Oliveira, LRM; Moura, YBF; Nascimento, TL; Bertini, LM; Pereira, AF. Antioxidant effects of *Citrus sinensis* peel essential oil in a bovine oocyte model. **Livestock Science**, v.276, 105324, 2023.

Barros, FDA; Adona, PR; Guemra, S; Damião, BCM. Oxidative homeostasis in oocytes competence for *in vitro* embryo development. **Animal Science Journal**, v.90, p. 1343-1349, 2019.

Baruselli, PS; Catussi, BLC; Abreu, LA; Elliff, FM; Silva, LG; Batista, EOS. Challenges to increase the AI and ET markets Brazil. **Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**, p. 1-12, 2019.

Belin, S; Kaya, F; Burtey, S; Fontes, M. Ascorbic acid and gene expression: another example of regulation of gene expression by small molecules. **Current Genomics**, v.11, p. 52-57, 2010.

Blerkom, JV. Mitochondrial function in the human oocyte and embryo and their role in developmental competence. **Mitochondrion**, v.11, p. 797-813, 2011.

Brackett, BG; Bousquet, D; Boice, ML; Donawick, WJ; Evans, JF; Dressel, MA. Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. **Biology of Reproduction**, v.27, p. 147-158, 1982.

Budani, MC; Tiboni, GM. Effects of supplementation with natural antioxidants on oocyte and preimplantation embryos. **Antioxidants**, v.9, n. 612, p. 1-25, 2020.

Cajas, YN; Beltrán, KC; Guevara, ML; Blanca, MGM; Ramos-Ibeas, P; Gutiérrez-Adán, A; Rizos, D; González, EM. Antioxidant nobiletin enhances oocytes maturation and subsequent embryo development and quality. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, p. 1-18, 2020.

Catala, MG; Roura, M; Soto-Heras, S; Menéndez, I; Contreras-Solis, I; Paramio, MT; Izquierdo. Effect of season on intrafollicular fatty acid concentrations and embryo production after *in vitro* fertilization and parthenogenic activation of prepubertal goat oocytes. **Small Ruminant Research**, v.168, p. 82-86, 2018.

Chen, X; Xuan, B; Xu, D; Wang, Q; Cheng, M; Jin, Y. Crocin supplementation during oocyte maturation enhances antioxidant defence and subsequent cleavage rate. **Reproduction in Domestic Animals**, v.54, p. 300-308, 2019.

Chowdhury, MMR; Choi, BH; Khan, I; Lee, KL; Mesalam, A; Song, SH; Xu, L; Joo, MD; Afrin, F; Kong, IK. Supplementation of lycopene in maturation media improves bovine embryo quality *in vitro*. **Theriogenology**, v.103, p. 173-184, 2017.

Dalvit, G; Llanes, SP; Descalzo, A; Insani, M; Beconi, M; Cetica, P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p. 93-97, 2005.

Das, S; Chattopadhyay, R; Ghosh, S; Gosh, S; Goswami, SK; Chakravarty, BN; Chaudhury, K. Reactive oxygen species level in follicular fluid- embryo quality marker in IVF? **Human Reproduction**, v.21, n.9, p. 2403-2407, 2006.

Davoodian, N; Kadivar, A; Mehrban, H. Supplementation of media with gamma-oryzanol as a novel antioxidant to overcome redox imbalance during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.59, n.1, e14503, 2024.

Denicol, AC; Siqueira, LGB. Maternal contributions to pregnancy success: from gamete quality to uterine environment. **Animal Reproduction**, v.20, n.2, p. 1-16, 2023.

Dode, MAN; Rumpf, R. Produção *in vitro* de embriões- eficiência, limitações e perspectivas futuras: visão da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. In: Anais do *Workshop* sobre embriões bovinos produzidos *in vitro*: perspectivas de utilização e possíveis impactos na pecuária brasileira. **Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento**. p. 13-26, 2002.

Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **American Physiological Society**, v.82, p. 47-95, 2002.

Dumollard, R; Duchen, M; Carroll, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. **Current Topics in Developmental Biology**, v.77, p. 21-48, 2007.

Eini, F; Bidadkosh, A; Nazarian, H; Piryaei, A; Novin, MG; Joharchi, K. Thymoquinone reduces intracytoplasmic oxidative stress and improves epigenetic modification in polycystic

ovary syndrome mice oocytes, during *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction & Development**, p. 1-14, 2019.

Fair, T; Hyttel, P; Greve, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular Reproduction and Development**, v.42, p. 437-442, 1995.

Ferré, LB, Kjelland, ME; Strobech, LB; Hyttel, P; Mermilliod, P; Ross, PJ. Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. **Animal**, v.14, n.5, 2020.

Ferreira, EM; Vireque, AA; Adona, PR; Meirelles, FV; Ferriani, RA; Navarro, PAAS. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: Structural and biochemical modification and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v.71, p. 836-848, 2009.

Fulka Jr, J; First, NL; Moor, RM. Nuclear and cytoplasmic determinants involved in the regulation of mammalian oocyte maturation. **Molecular Human Reproduction**, v.4, n.1, p. 41-48, 1998.

Gandolfi, BTAL; Gandolfi, F. The maternal legacy to the embryo: Cytoplasmic components and their effects on early development. **Theriogenology**, v.55, p. 1255-1276, 2001.

Ge, H; Tollner, TL; Hu, Z; Dai, M; Li, X; Guan, H; Shan, D; Zhang, X; LV, J; Huang, C; Dong, Q. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation *in vitro* on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. **Molecular Reproduction & Development**, v.79, p. 392-401, 2012.

Goto, Y; Noda, Y; Mori, T; Nakano, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured *in vitro*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.15, p. 69-75, 1993.

Guemra, S; Monzani, PS; Santos, ES; Zanin, R; Ohashi, OM; Miranda, MS; Adona, PR. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com queracetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p. 1616-1624, 2013.

Harris, SE; Leese, HJ; Gosden, RG; Picton, HM. Pyruvate and oxygen consumption throughout the growth and development of murine oocytes. **Molecular Reproduction & Development**, v.76, p. 231-238, 2009.

Hyttel, P; Xu, KP; Smith, S; Greve, T. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. **Journals of Reproduction & Fertility**, v.78, 615-625, 1986.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas)**. Rio de Janeiro: IBGE, 2022.

IETS. 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In: **Embryo Technology Newsletter**, v.40, n.4, p. 01-19, 2022.

Khan, I; Chowdhury, MMR; Song, SH; Mesalam, A; Zhang, S; Khalil, AAK; Jung, EH; Kim, JB; Jafri, L; Mirza, B; Kong, IK. Lupeol supplementation improves the developmental competence of bovine embryos *in vitro*. **Theriogenology**, v.107, p. 203-210, 2018.

Khazaei, M; Aghaz, F. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during *in vitro* maturation of oocytes. **International Journal of Fertility and Sterility**, v.11, n.2, p. 63-70, 2017.

Krisher, RL. The effect of oocyte quality on development. **Journal of Animal Science**, v.82, p. 14-23, 2004.

Kruip, TAM; Cran, DG; Beneden, TH; Dieleman, SJ. Structural changes in bovine oocytes during final maturation *in vitro*. **Gamete Research**, v.8, p. 29-47, 1983.

Kubelka, M; Motlík, J; Schultz, RM; Pavlok, A. Butyrolactone I reversibly inhibits meiotic maturation of bovine oocytes, without influencing chromosome condensation activity. **Biology of Reproduction**, v.62, p. 292-302, 2000.

Lalan, G; Thirumal, M; Ankul, SS; Anant, N. Phytochemical screening and *in vitro* evaluation of antibacterial antioxidant properties of *Moringa oleifera* linn leaf extract. **Research Journal of Pharmacy and Technology**, v.16, p. 4512-4518, 2023.

Landim-Alvarenga, FC; Maziero, RRD. Control of oocyte maturation. **Animal Reproduction**, v.11, n.3, p.150-158, 2014.

Lee, Y; Shim, J; Ko, N; Kim, HJ; Park, JK; Kwak, K; Kim, H; Choi, K. Effect of alanine supplementation during *in vitro* maturation on oocyte maturation and embryonic development after parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer in pigs. **Theriogenology**, v.127, p. 80-87, 2019.

Leone, A; Spada, A; Battezzati, A; Schiraldi, A; Aristil, J; Bertoli, S. Cultivation, genetic, ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera* leaves: An overview. **International Journal of Molecular Sciences**, v.16, p. 12791-12835, 2015.

Leone, A; Spada, A; Battezzati, A; Schiraldi, A; Aristil, J; Bertoli, S. *Moringa oleifera* seeds and oil: Characteristics and uses for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p. 1-14, 2016.

Leoni, GG; Palmerini, MG; Satta, V; Succu, S; Pasciu, V; Zinelli, A; Carru, C; Macchiarelli, G; Nottola, AS; Naitana, Salvatore; Berlinguer, F. Differences in the kinetic of the first meiotic division and active mitochondrial distribution between prepubertal and adult oocytes mirror differences in their developmental competence in a sheep. **PloS ONE**, v.10, n.4, p. 1-5, 2015.

Lin, J; Wang, L. Oxidative stress in oocyte and embryo development: implications for *in vitro* systems. **Antioxidants and Redox Signaling**, p. 1-38, 2020.

Liu, L; Trimarchi, JR; Keefe, DL. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, v.62, p. 1745-17553, 2000.

Liu, Y; Wang, X; Wei, X; Gao, Z. Values, properties and utility of different parts of *Moringa oleifera*: an overview. **Chinese Herbal Medicines**, v.10, p. 371-378, 2018.

Lonergan, P; Khatir, H; Carolan, C; Mermilliod, P. Bovine blastocyst production *in vitro* after inhibition of oocyte meiotic resumption for 24h. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.109, p. 355-365, 197.

Magata, F; I detta, A; Okubo, H; Matsuda, F; Urakawa, M; Oono, Y. Growth potential of bovine embryos presenting abnormal cleavage observed through time lapse cinematography. **Theriogenology**, v.133, p. 119-124, 2019.

Maillo, V; Lopera-Vasquez, R; Hamdi, M; Gutierrez-Adan, A; Lonergan, P; Rizos, D. Maternal-embryo interaction in the bovine oviduct: Evidence from *in vivo* and *in vitro* studies. **Theriogenology**, v.86, p. 443-450, 2016.

Matos, L; Stevenson, D; Gomes, F; Silva-Carvalho, JL; Almeida, H. Superoxide dismutase expression. In human cumulus oophorus cells. **Molecular Human Reproduction**, v.15, n.7, p. 411-419, 2009.

Oliveira, LRM; Aquino, LVC; Santos, MVO; Freitas, VJF; Bertini, LM; Pereira, A. Antioxidant effect of bioactive compounds isolated from *Syzygium aromaticum* essential oil on the *in vitro* developmental potential of bovine oocytes. **Livestock Science**, v.260, 104932, 2022.

Paikra, BK; Dhongade, HKJ; Gidwani, B. Phytochemistry and pharmacology of *Moringa oleifera Lam*. **Journal of Pharmacopuncture**, v.20, n.3, p. 194-200, 2017.

Piras, AR; Menéndez-Blanco, I; Soto-Heras, S; Catalá, MG; Izquierdo, D; Bogliolo, L; Paramio, MT. Resveratrol supplementation during *in vitro* maturation improves embryos development of prepubertal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. **Journal of Reproduction and Development**, v.65, n.2, p. 113-120, 2019.

Pollini, L; Tringaniello, C; Ianni, F; Blasi, F; Manes, J; Cossignani, L. Impact of ultrasound extraction parameters on the antioxidant properties of *Moringa oleifera* leaves. **Antioxidants**, v.277, n.9, p. 1-14, 2020.

Procházková, D; Bousová, I; Wilhelmová, N. Antioxidants and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v.82, p. 513-523, 2011.

Rani, NZA; Husain, K; Kumolosasi, E. Moringa Genus: A review of phytochemistry and Pharmacology. **Frontiers in Pharmacology**, p. 1-26, 2018.

Rasheed, A; Azeez, RFA. Chapter- A review on natural antioxidants. **Traditional and Complementary Medicine**, p. 1-24, 2019.

Rizos, D; Ward, F; Duffy, P; Boland, MP; Lonergan, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization or early embryo development *in vitro* versus *in vivo*: Implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p. 234-248, 2002.

Rodrigues-Cunha, MC; Mesquita, LG; Bressan, F; Collado, M; Balieiro, JCC; Schwarz, KRL; Castro, FC; Watanabe, OY; Watanabe, YF. Effects of melatonin during IVM in defined

medium on oocyte meiosis, oxidative stress, and subsequent embryo development. **Theriogenology**, v.86, n.7, p. 1685-1694, 2016.

Romek, M; Gajda, B; Krzystofowicz, E; Kucia, M; Uzarowska, A; Smorag, Z. Improved quality of porcine embryos cultures with hyaluronan due to the modification of the mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species level. **Theriogenology**, v.102, p. 1-9, 2017.

Sabatini, L; Wilson, C; Lower, A; Al-Shawaf, T; Grudzinskas, G. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v.72, n.6, p. 1027-1034, 1999.

Saini, KR; Sivanesan, I; Keum, YS. Phytochemicals of *Moringa oleifera*: A review of their nutritional, therapeutic and industrial significance. **3 Biotech**, v.203, n.6, p. 1-14, 2016.

Santos, TA; Shourbagy, SE; John, JCS. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, v.85, n.3, p. 1-8, 2006.

Santos, MVO; Borges, AA; Queiroz Neta, LB; Bertini, LM; Pereira, AF. Use of natural antioxidants in *in vitro* mammalian embryo production. **Semina: Ciências Agrárias**, v.39, n.1, p. 431-443, 2018.

Santos, MVO, Nascimento, LE; Praxedes, EA; Borges, AA; Silva, AR; Bertini, LM; Pereira, AF. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocytes maturation improves parthenogenetic embryonic development. **Theriogenology**, v.128, p. 74-80, 2019.

Segwatiibe, MK; Cosa, S; Bassey, K. Antioxidant and antimicrobial evaluations of *Moringa oleifera* Lam leaves extract and isolates compounds. **Molecules**, v.28, n.2, p. 1-22, 2023.

Sharma, V; Paliwal, R; Pracheta, Sharma, S. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. Pods. **Journal of Pharmacy Research**, v.4, n.2, p. 554-557, 2011.

Shu, Y; Zeng, H; Ren, Z; Zhuang, G; Liang, X; Shen, H; Yao, S; Ke, P; Wang, N. Effects of cilostamide and forskolin on the meiotic resumption and embryonic development of immature human oocytes. **Human Reproduction**, v.23, n.3, p. 504-513, 2008.

Sies, H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox Biology**, v.4, p. 180-183, 2015.

Sirard, MA; Richard, F; Blondin, P; Robert, C. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v.65, p. 126-136, 2006.

Sirard, MA. 40 years of bovines IVF in the new genomic selection context. **Reproduction**, v.156, R1-R7, 2018.

Soto-Heras, S; Paramio, MT. Impacto f oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v.132, p. 342-350, 2020.

Sovernigo, TC, Adona, PR, Monzani, OS, Guemra, S; Barros, FDA, Lopes, FG; Leal, CLV. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, p. 1-9, 2017.

Steptoe, PC; Edwards, RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. **The Lancet**, p. 366, 1978.

Sugunabai, J; Jayaraj, M; Karpagam, T; Varalakshmi, B. Antidiabetic efficiency of *Moringa oleifera* and *Solanum nigrum*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v.6, n.1, p. 40-42, 2014.

Sultana, S. Nutritional and functional properties of *Moringa oleifera*. **Metabolism Open**, v.8, p. 1-6, 2020.

Tesfay, SZ; Bertling, I; Odindo, AO; Workneh, TS; Mathaba, N. Levels of anti-oxidants in different parts of moringa (*Moringa oleifera*) seedling. **African Journal of Agricultural Research**, v.6, n.22, p. 5123-5132, 2011.

Tiloke, C; Anand, K; Gengan, RM; Chuturgoon, AA. *Moringa oleifera* and their phytonanoparticles: Potential antiproliferative agents against cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.108, p. 457-466, 2018.

Tripathi, A; Kumar, KVP; Chaube, SK. Meiotic cell cycle arrest in mammalian oocytes. **Journal of Cellular Physiology**, v.233, p. 592-600, 2010.

Trounson, A; Aderiesz, C; Jones, G. Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. **Reproduction**, v.121, p. 51-75, 2001.

Tomek, W; Torner, H; Kanitz, W. Comparative analysis of protein synthesis, transcription and cytoplasmic polyadenylation of mRNA during maturation of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.37, p. 86-91, 2002.

Turrens, JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v.552, n.2, p.335-344, 2003.

Valdez-Solana, MA; Mejía-García, VY; Téllez-Valencia, A; García-Arenas, G; Salas-Pacheco, J; Alba-Romero, J; Sierra-Campos, E. Nutritional content and elemental and phytochemical analyses of *Moringa oleifera* Grow in Mexico. **Journal of Chemistry**, v.2015, p. 1-9, 2015.

Van Wagendonk-de Leeuw, AM. Ovum pick up and *in vitro* production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, v.65, p. 914-925, 2006.

Varago, FC; Mendonça, LF; Lagares, MA. Produção *in vitro* de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p. 100-109, 2008.

Vats, S; Gupta, T. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. From Rajasthan, India. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.23, p.239-248, 2017.

Vergara-Jimenez, M; Almatrafi, MM; Fernandez, ML. Bioactive componentes in *Moringa oleifera* leaves protect against chronic disease. **Antioxidants**, v.6, n.91, p.1-13, 2017.

Viana, JHM. Produção de embriões bovinos in vivo (transferência de embriões - TE) e in vitro (Fecundação in vitro FIV) no Brasil: histórico, cenário atual e perspectivas. **Anais do Simpósio de Reprodução de Bovinos**, 1^a Ed., Pelotas, RS, Brasil, p. 48-55, 2008.

Wang, X; Falcone, T; Attaran, M; Goldberg, JM; Agarwal, A; Sharma, R. Vitamin C and vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, n.6, p. 1272-1277, 2002.

Wang, F; Tian, X; Zhang, L; He, C; Ji, P; Li, Y; Tan, D; Liu, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. **Reproductive Science**, v.101, n.2, p. 578-586, 2014.

Wang, S; He, G; Chen, M; Zuo, T; Xu, W; Liu, X. The role of antioxidant enzymes in the ovaries. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2017, p. 1-14, 2017.

Wang, Y; Gao, Y; Ding, H; Liu, S; Han, X; Gui, J; Liu, D. Subcritical ethanol extraction of flavonoids from *Moringa oleifera* leaf and evaluation of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.218, p. 152-158, 2017.

Watson, AJ. Oocyte cytoplasmatic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, v.85, E1-E3, 2007.

Yang, M; Tao, L; Kang, X; Wang, Z; Su, L; Li, L; Gu, F; Zhao, C; Sheng, J; Tian, Y. *Moringa oleifera* Lam. leaves as new raw food material: A review of its nutritional composition, functional properties and comprehensive application. **Trends in Food Science & Technology**, v.138, p.399-416, 2023.

Zhao, B; Ding, X; Wang, X; Sun, Y; Gao, S; Song, X; Zhang, B; Zhang, Y; Wang, Y. Supplementation with kaempferol relieves oxidative stress and enhances development of early bovine embryos *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.57, p. 1007-1015, 2022.

Capítulo 2

CAPÍTULO 2: Suplementação com diferentes concentrações do extrato de *Moringa oleifera* em meios de maturação *in vitro* de oócitos bovinos

RESUMO

Uma das principais causas da ineficiência na Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) é o estresse oxidativo. Para mitigá-lo, a incorporação de antioxidantes em meios de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos é uma estratégia eficaz, visto que auxilia na regulação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs). A *Moringa oleifera*, antioxidante exógeno natural, apresenta potencial promissor para uso durante a MIV. O presente estudo avaliou o emprego de diferentes concentrações do extrato de *Moringa oleifera* nos meios MIV, com foco em sua eficácia na maturação nuclear e citoplasmática de oócitos, além do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e quantificação dos níveis de EROs. Os oócitos foram maturados *in vitro* em cinco condições experimentais: M0 (sem antioxidantes, controle negativo), M50 (50 µg/mL), M100 (100 µg/mL), M150 (150 µg/mL) e VIT C (50 µg/mL, controle positivo). No Experimento I, foram avaliadas a expansão e a viabilidade das células do *cumulus*. Não houve diferença significativa nas taxas de expansão das células do *cumulus* ($p > 0,05$), mas o grupo VIT C apresentou maior viabilidade celular em relação aos demais grupos ($p < 0,05$). Na maturação nuclear, os grupos M50, M150 e VIT C aumentaram o percentual de oócitos em MII ($p < 0,05$). No Experimento II, os oócitos foram avaliados quanto à maturação citoplasmática, por meio da distribuição mitocondrial, e níveis de ($\Delta\Psi_m$). No experimento III, os níveis de EROs foram avaliados por marcação com H2DCFDA. Os grupos M50 e VITC exibiram menor intensidade de marcação, indicando menor presença de EROs ($p < 0,05$). Os resultados indicam que o extrato de *Moringa oleifera*, na concentração de 50 µg/mL, demonstrou eficácia no suporte à maturação nuclear, sem comprometer a viabilidade das células do *cumulus*, além de reduzir o estresse oxidativo e otimizar a função mitocondrial dos oócitos bovinos durante a MIV. No entanto, estudos adicionais são necessários para investigar os efeitos desse antioxidante nos mecanismos envolvidos na ativação mitocondrial e no desenvolvimento embrionário subsequente.

Palavras-chave: biotecnologias reprodutivas, produção *in vitro* de embriões, bovinos, extrato hidroalcoólico, maturação nuclear, estresse oxidativo

1. INTRODUÇÃO

Segundo dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), observou-se um expressivo aumento de 15,8% no número global de embriões bovinos produzidos *in vitro*, em comparação ao ano de 2022 (IETS, 2024).

Esse crescimento expressivo ao longo dos anos tem incentivado pesquisas constantes na busca por componentes adicionais que possam ser integrados nas etapas da Produção *in vitro* de Embriões (PIVE), especialmente durante a etapa de maturação *in vitro* (MIV) (Baruselli et al., 2019; Cajas et al., 2020; Davoodian et al., 2024). Essa etapa, considerada crucial, ainda apresenta limitações que impactam o desempenho das fases subsequentes da PIVE (Cavallari et al., 2019; Soto-Heras & Paramio, 2020).

Para que a MIV seja eficaz, é essencial que ocorra um desenvolvimento oocitário adequado, o que depende de sua capacidade de alcançar a competência necessária por meio de modificações estruturais, moleculares e bioquímicas (Hytel et al., 1986; Coticchio et al., 2015). Essas modificações demandam uma grande quantidade de energia, suprida pelo aumento da atividade mitocondrial. As mitocôndrias, ao intensificarem a síntese de trifosfato de adenosina (ATP), garantem o fornecimento de energia suficiente para o desenvolvimento do oócito (Reynier et al., 2001; Santos et al., 2006; Munakata et al., 2016).

Entretanto, Durante a produção de ATP pelas mitocôndrias, por meio da fosforilação oxidativa (OXPHOS), são geradas espécies reativas de oxigênio (EROs) como subprodutos do metabolismo celular. Quando essas espécies são produzidas em excesso, podem causar um desequilíbrio celular, acarretando um estresse oxidativo (Stojkovic et al., 2001; Ge et al., 2012; Eini et al., 2018).

O estresse oxidativo é uma das principais causas de ineficiência no desenvolvimento de oócitos e embriões produzidos *in vitro*, impactando negativamente não apenas a fase de maturação, mas também as etapas subsequentes de fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) ou desenvolvimento embrionário (Leite et al., 2017). No entanto, em condições normais, as EROS não induzem o estresse oxidativo, pelo contrário, desempenham funções benéficas e essenciais como moléculas sinalizadoras no processo reprodutivo. Elas são de suma importância para a expansão das células do cumulus e, *in vivo*, tem um papel crucial na retomada da meiose e em todo o processo que culmina na liberação dos oócitos durante a ovulação e sua maturação (Shkolnik et al., 2011; Cao et al., 2020).

Diante disso, para otimizar o desempenho na PIVE, é fundamental preservar o equilíbrio oxidativo (Sabatini et al., 1999). Uma abordagem eficaz para alcançar essa homeostase é a incorporação de antioxidantes em meios de MIV, que auxiliam na regulação dos níveis de EROS.

e mitigam os potenciais danos causados pelo estresse oxidativo (Romek et al; 2017, Sovernigo et al., 2017; Cajas et al., 2020; Aquino et al., 2023).

Os antioxidantes naturais representam uma excelente alternativa que vem sendo amplamente estudados, visto que ajudam a atenuar os efeitos deletérios das EROs, promovendo a homeostase oxidativa. Além disso, esses compostos têm demonstrado potencial para aumentar as taxas de maturação, fertilização e formação de blastocistos (Wang et al., 2014; Sovernigo et al., 2017; Piras et al., 2018; Zhao et al., 2022; Wang et al., 2024).

Um exemplo promissor de antioxidante exógeno natural é o obtido a partir da planta *Moringa oleifera*. Amplamente estudada por suas propriedades nutricionais e medicinais, a moringa é rica em compostos antioxidantes e tem mostrado benefícios significativos em contextos experimentais não apenas devido sua ação antioxidante, mas também devido suas propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias, antifúngicas, anticarcinogênicas, antidiabéticas, dentre outras (Sharma et al., 2011; Leone al., 2016; Sultana et al., 2020; Vats & Gupta, 2017). Esses benefícios podem ser relevantes para a PIVE, contribuindo para a melhoria dos resultados de maturação e desenvolvimento de oócitos.

Dante deste cenário, é de grande relevância realizar estudos que investiguem o uso da Moringa oleífera na MIV, com foco no equilíbrio das EROs e na melhoria da etapa de MIV da PIVE de bovinos. Isso se justifica pela escassez de pesquisas que explorem os reais efeitos do extrato de Moringa oleífera em experimentos *in vitro* na área de biotecnologia reprodutiva animal (Barakat et al., 2015). Assim, hipotetiza-se que o uso do extrato de *Moringa oleífera* nos meios de MIV será capaz de melhorar o desempenho dos oócitos bovinos, por meio da redução das EROs e melhoria no desempenho mitocondrial.

Frente ao exposto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o emprego do extrato de *Moringa oleífera* em meios de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, com foco em sua influência na maturação nuclear e citoplasmática, além da quantificação dos níveis de EROs. Especificamente, buscou-se:

Experimento I- Analisar os efeitos da *Moringa oleífera* na expansão e na viabilidade das células do cumulus e na maturação nuclear de oócitos nos diferentes grupos experimentais e determinar se a adição de moringa nos meios de maturação promove o aumento na taxa de oócitos que atingem o estágio de metáfase II (MII);

Experimento II- Analisar os efeitos da *Moringa oleífera* na maturação citoplasmática de oócitos bovinos por meio da avaliação de distribuição mitocondrial e nos níveis de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em oócitos bovinos;

Experimento III- Analisar o efeito da *Moringa oleifera* nos níveis EROs intracelular em óocitos bovinos e verificar se o uso do extrato reduz a liberação de EROs e o potencial de membrana mitocondrial durante a maturação oocitária.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Todo o experimento foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro para Experimentação Animal (COBEA), após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade de Uberaba sob o protocolo número 009/2021 (Normas éticas- Anexo 1).

O projeto foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos, localizado no Hospital Veterinário da Uniube (HVU) da Universidade de Uberaba (Uniube). As avaliações de maturação nuclear, maturação citoplasmática, quantificação dos níveis de EROs e potencial de membrana mitocondrial realizadas por meio de microscópio de fluorescência.

2.1. Preparo do extrato da *Moringa oleifera*

Para a obtenção do extrato, as folhas da *Moringa oleifera* foram coletadas em maio de 2022 no município de Catalão, situado no sudeste do estado de Goiás, Brasil. A região possui características morfoclimáticas típicas dos cerrados, com uma altitude variando entre 650 e 1.200 metros, temperatura média de 24°C e precipitação média anual de aproximadamente 1400 mm.

As folhas, uma vez coletadas, foram transportadas em caixas de papelão, contendo um fundo revestido por papel toalha, para Uberaba, localizada no estado de Minas Gerais, Brasil. Para realizar o processo de secagem, as folhas foram dispostas sobre uma bancada, com papel toalha posicionado entre elas e a superfície da bancada ao longo de sete dias (Figura 1). Três vezes ao dia, as folhas foram reviradas para que ambos os lados ficassem devidamente secos (Barakat et al., 2015).



Figura 1. Imagem das folhas de *Moringa oleifera* dispostas sobre bancada coberta com papel toalha. As folhas foram reviradas 3 vezes ao dia para que ambos os lados secassem. Tal procedimento foi realizado por 7 dias.

Após a secagem, as folhas foram mantidas em estufa de temperatura controlada a 50 °C, durante três dias consecutivos, para finalizar e garantir a secagem por completo.

Utilizando-se gral e pistilo deu-se início a maceração das folhas, seguida pela passagem na peneira tamis 10 e tamis 20, resultando assim no pó da folha de *Moringa oleifera* (Figura 2).



Figura 2. Preparação do pó das folhas de *Moringa oleifera* para produção do extrato hidroalcóolico, no Laboratório de Farmacologia da Universidade de Uberaba (Uniube). A. Folhas secas prontas para o processo de maceração. B. Maceração das folhas realizada em um gral com auxílio de um pistilo. C. Após maceração, o pó foi peneirado sucessivamente nas malhas de tamis 10 e 20. D. Pó resultante da maceração e peneiragem das folhas de *Moringa oleifera*, finalizado e pronto para produção do extrato hidroalcóolico

Para extração foram utilizadas 20 gramas deste pó, o qual foi colocado em um Erlenmeyer contendo 100 mL de água destilada e 100 mL de etanol a 95%, obtendo-se a concentração de 10%, e este foi mantido sob agitador durante 48 horas.

Após 48h este conteúdo foi transferido para um funil de Büchner com papel filtro sob Kitassato e utilizou-se uma bomba de vácuo juntamente com sistema de filtração para filtrar e obter o extrato líquido. Feito isto, o conteúdo extraído foi mantido em estufa com temperatura controlada a 50 °C até evaporação completa do solvente, o que levou 15 dias e resultou em massa firme do extrato seco que, posteriormente, foi macerado em gral com auxílio do pistilo para obtenção do pó. Para finalizar, o extrato em pó foi armazenado em pote de vidro esterilizado, vedado com Parafilm® (Kasvi, São José dos Pinhais, PR, Brasil), envolto por papel alumínio, alocado em tubo Falcon e congelado para que fosse utilizado quando necessário (Figura 3). A preparação do extrato segue a metodologia proposta por Barakat et al. (2015).

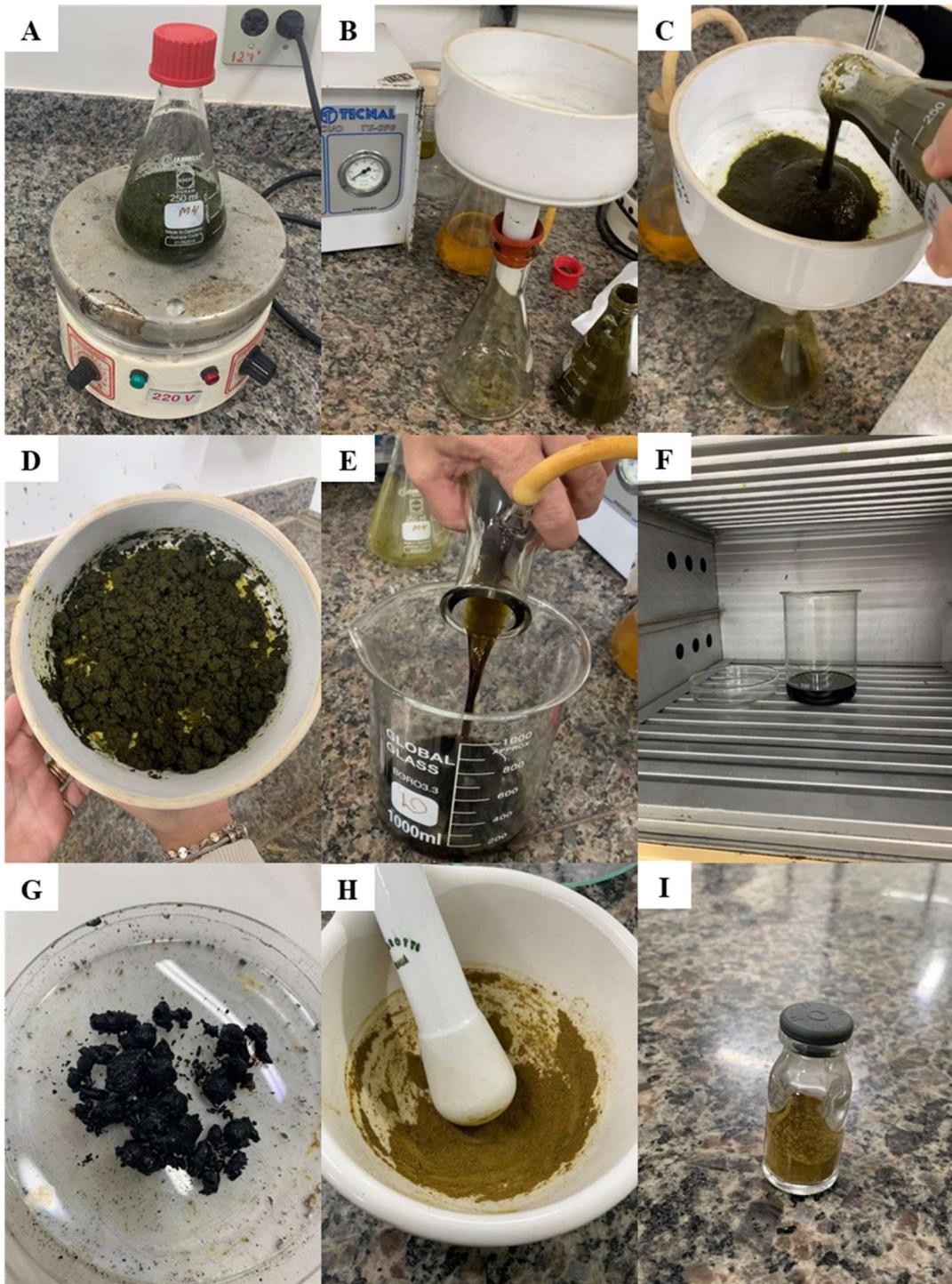


Figura 3. Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas de *Moringa oleifera*, no Laboratório de Farmacologia da Universidade de Uberaba (Uniube). A. Notar conteúdo presente no Erlenmeyer contendo 20 gramas do pó das folhas de *Moringa oleifera*, 100 mL de água destilada e 100 mL de etanol a 95%, obtendo-se a concentração de 10%, após 48 horas de agitação. B. Preparação da bomba à vácuo juntamente com sistema de filtração e funil de Büchner com papel filtro sobre um Kitassato. C. Início da filtração à vácuo, depositando-se o conteúdo agitado por 48 horas no funil de Büchner com papel filtro. D. Notar massa seca restante após a finalização da filtração à vácuo. E. Extrato hidroalcoólico líquido obtido após filtração a vácuo. F. Becker contendo o extrato hidroalcoólico líquido que foi mantido em estufa com temperatura controlada a 50 °C até evaporação completa do solvente. G. Após 15 dias, a evaporação completa do solvente resultando em uma massa firme do extrato. H. Maceração da massa firme do extrato seco em um gral com auxílio do pistilo para obtenção do extrato em pó. I. Armazenamento do extrato seco em pó em um pote de vidro estéril.

2.2. Coleta dos ovários e punção folicular

Para o presente estudo foram utilizados ovários bovinos advindos do frigorífico abatedouro comercial Boi Bravo, localizado no município de Uberaba- MG.

Para as coletas, em uma garrafa térmica de 2,5 L, depositou-se 500 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%, JP Indústria Farmacêutica S.A., Ribeirão Preto, SP, Brasil), previamente aquecida entre 35 e 38 °C. Após este processo, a garrafa foi transferida para o frigorífico, onde os funcionários responsáveis realizavam a coleta dos ovários. Ao fim de cada coleta, a garrafa foi transportada para o Laboratório de Pesquisa em Sanidade e Produção Animal nos Trópicos – Uniube, localizado no Hospital Veterinário da Uniube (HVU), da Universidade de Uberaba.

No laboratório, os ovários foram lavados com NaCl 0,9% previamente aquecida entre 35 e 38 °C até que um aspecto translúcido fosse obtido e, posteriormente, mantidos imersos em solução de NaCl 0,9% em banho maria (BM) a 37 °C até o momento da punção folicular (Figura 4). Todos os folículos com diâmetro entre 2 e 8 mm foram aspirados com seringas de 10 mL e agulhas 30 x 0,8 mm (21G 1/4) (Figura 5).

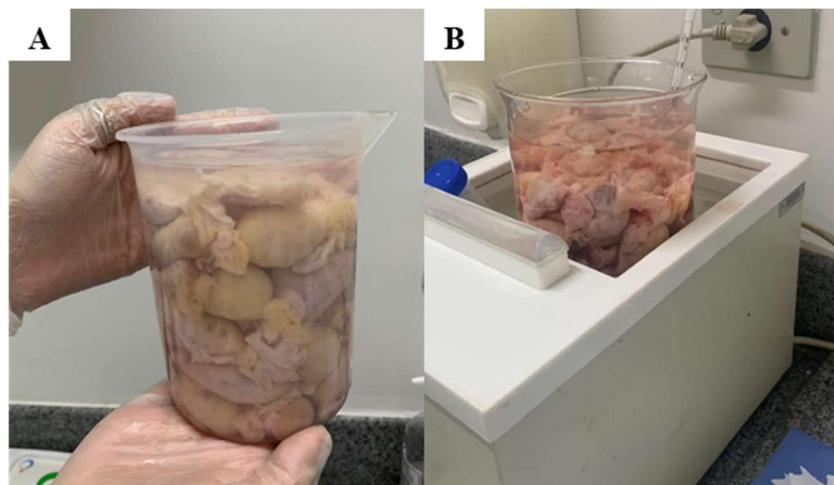


Figura 4. Preparação dos ovários bovinos para punção folicular após a coleta que foi realizada no frigorífico abatedouro Boi Bravo, situado no município de Uberaba-MG. A. Ovários lavados em NaCl 0,9%, previamente aquecida entre 35 e 38 °C, até ficarem com aspecto translúcido. B. Ovários imersos em solução de NaCl 0,9%, e mantidos em banho maria entre 35 e 38 °C até momento da aspiração folicular.



Figura 5. Ovário bovino, coletado no frigorífico abatedouro Boi Bravo, situado no município de Uberaba-MG. Observar folículos ovarianos de diversos diâmetros (setas pretas). Apenas aqueles entre 2 e 8 mm foram aspirados.

Após a aspiração, retirou-se a agulha da seringa, para que o líquido folicular fosse depositado em tubo Falcon de 50 mL. Tal tubo foi mantido em BM, em posição vertical por 10 minutos para que os óócitos precipitassem e ocorresse a formação do *pellet* (Figura 6). Em seguida, o precipitado foi pipetado e transferido para mini filtro de óócitos (WTA, Cravinhos, SP, Brasil) que, posteriormente, foi invertido e lavado com solução salina tamponada (PBS-Solução salina tamponada com fosfato, Sigma- Aldrich® Corporation, St. Louis, EUA) e disposto sob placa de Petri 100 x 20 mm (Figura 7).

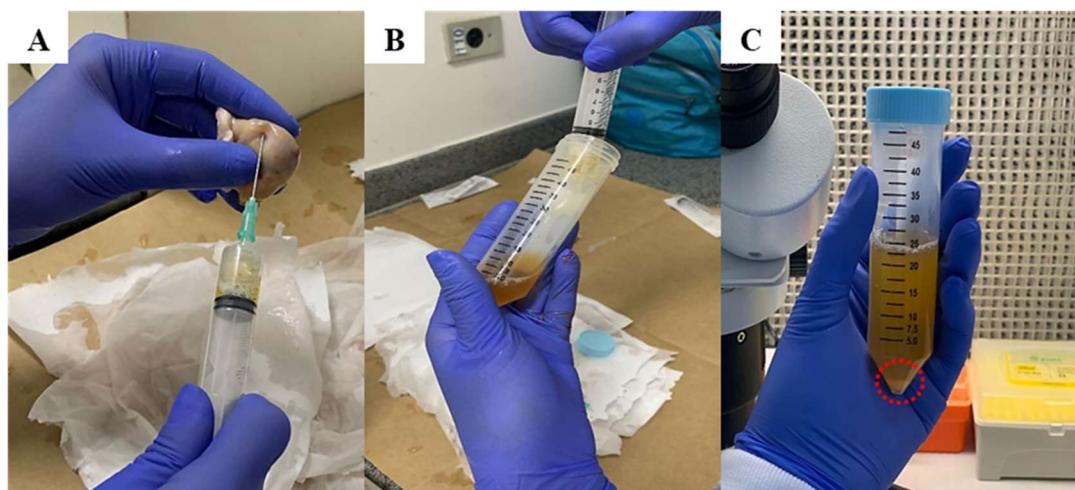


Figura 6. Aspiração folicular de óócitos provenientes de ovários bovinos coletados em frigorífico abatedouro Boi Bravo, situado no município de Uberaba-MG. **A.** Os folículos entre 2 e 8 mm, foram aspirados com auxílio de agulha 30 x 8 mm e seringa de 10 mL. **B.** Notar que o líquido folicular foi cuidadosamente depositado na parede do tubo Falcon de 50 mL. **C.** Após 10 minutos de repouso com o tubo Falcon em posição vertical, mantido em banho maria a 37 °C, notar a formação do *pellet* no fundo do tubo (região circundada em vermelho).

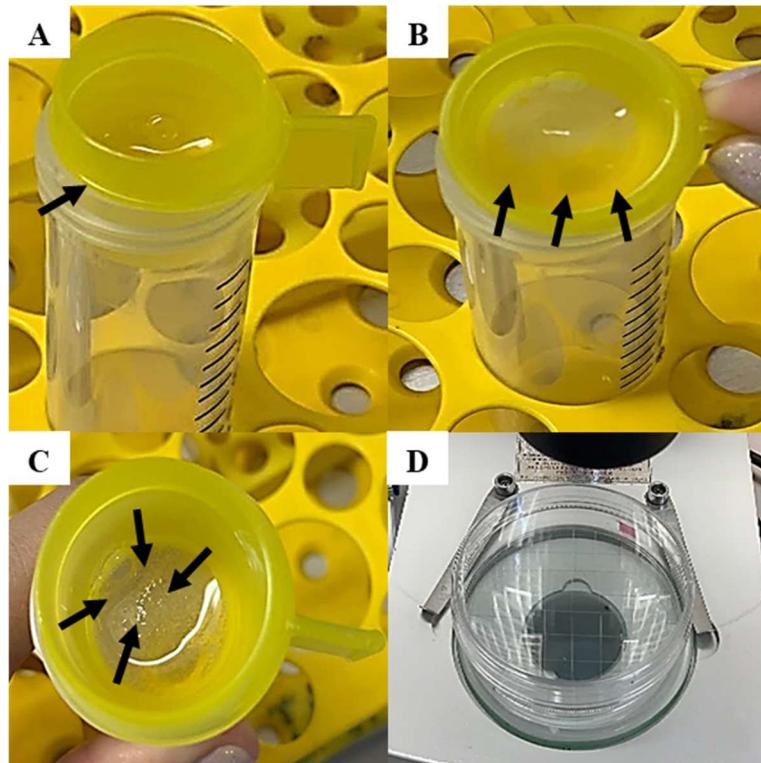


Figura 7. Filtragem do *pellet* para seleção dos oócitos após aspiração folicular de ovários provenientes de frigorífico abatedouro localizado em Uberaba-MG. **A.** Após a formação do *pellet*, este foi cuidadosamente pipetado em mini filtro para oócitos. Observe o mini filtro sobre tubo Falcon de 50 mL contendo o conteúdo pipetado (seta preta). **B.** Momento em que o *pellet* contendo os oócitos foi filtrado (setas pretas) **C.** Imagem obtida após filtragem do *pellet*. Nota-se no fundo do mini filtro o conteúdo que foi filtrado, pronto para ser utilizado (setas pretas). **D.** Placa de Petri previamente preparada, de 100 x 20 mm, para receber o fluido contendo os oócitos que foi filtrado, invertido e lavado sobre a placa para o rastreamento subsequente.

2.3. Seleção dos oócitos e Maturação *in vitro*

Os oócitos foram selecionados e classificados em relação à qualidade do citoplasma e o número de camadas de células do *cumulus oophorus*, com auxílio de estereomicroscópio. Apenas os oócitos classificados em grau 1 e 2 foram selecionados para a maturação (Figura 8). A classificação segue a metodologia proposta por Gonçalves et al. (2008) (Tabela 1).

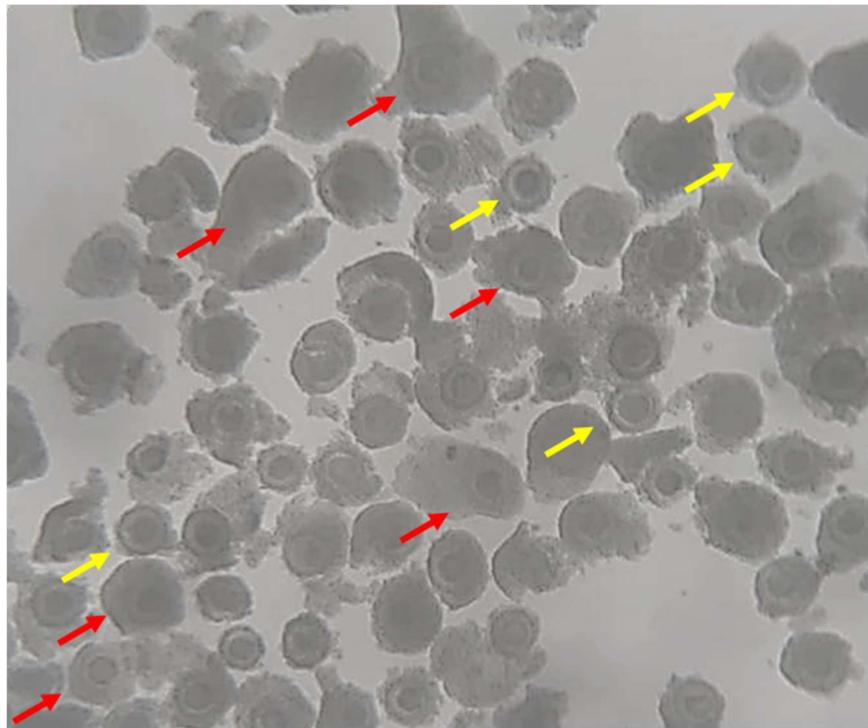


Figura 8. Imagem, em aumento de 40x, de oócitos bovinos após seleção e classificação. Considerando que apenas aqueles selecionados e classificados como Grau 1 (exemplificados pelas setas vermelhas) e Grau 2 (exemplificados pelas setas amarelas) prosseguiram para a etapa de maturação *in vitro* (MIV).

Tabela 1. Classificação dos oócitos bovinos segundo as características dos complexos *cumulus oophurus* (CCOs) e citoplasma, de acordo com a metodologia de Gonçalves et al. (2008).

Grau 1	CCOs compactos, contendo mais de três camadas de células. Citoplasma homogêneo
Grau 2	CCOs compactos, contendo número de camadas de células igual ou menor do que três. Citoplasma com granulação distribuída de modo heterogêneo.
Grau 3	<i>Cumulus oophurus</i> presente, porém expandido. Citoplasma contraído, degenerado ou fragmentado.
Grau 4	Oócio desnudos, sem células do <i>Cumulus oophurus</i> ao seu redor.

Os oócitos selecionados foram transferidos para gotas de 100 µL de PBS e, por fim, foram lavados em, 4 gotas de 100 µL de BotuFIV Oocyte Wash® (Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu, SP, Brasil), com intuito de remover o excesso de debríis celulares (Figura 9).

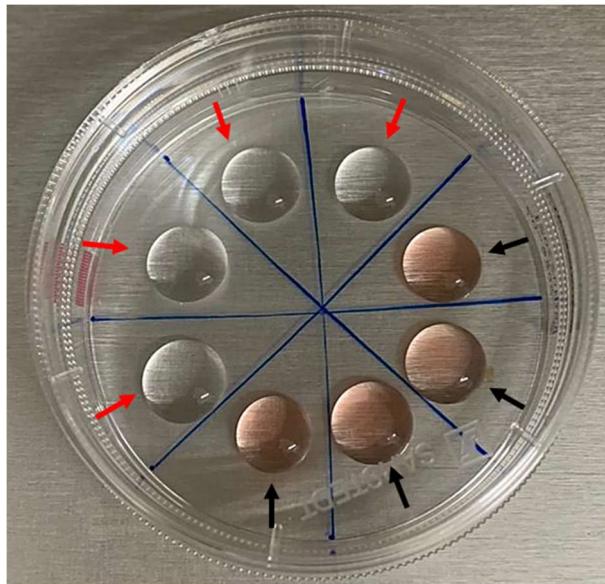


Figura 9. Placa de Petri de 60 mm contendo 4 gotas de 100 µL de PBS (indicadas pelas setas vermelhas) e 4 gotas de 100 µL de BotuFIV Oocyte Wash® (indicadas pelas setas pretas). As gotas de PBS foram usadas para seleção dos oócitos, enquanto as de BotuFIV Oocyte Wash® foram destinadas à remoção do excesso de debris celulares.

Após esta etapa, a quantidade de oócitos obtidos foi estimada e dividida em cinco grupos experimentais: M0 – sem antioxidante, controle negativo (-), M50 - *Moringa oleifera* 50 µg/mL, M100 - *Moringa oleifera* 100 µg/mL, M150 - *Moringa oleifera* 150 µg/mL e VITC - vitamina C (A4403- Sigma- Aldrich® Corporation, St. Louis, EUA) 50 µg/mL, controle positivo (+). Cerca de 25 a 30 oócitos foram transferidos para gotas de 100 µL de meio MIV BotuFIV IVM® (Botupharma Biotecnologia Animal, Botucatu, SP, Brasil) acrescidas de 10% de soro fetal bovino (SFB- Soro Fetal Bovino, Sigma- Aldrich® Corporation, St. Louis, EUA) e com adição de seus respectivos tratamentos (q.s.p.). Essas gotas foram colocadas em placa de Petri de 30 mm (conforme indicado na Tabela 2) e, em seguida, foram cobertas com óleo mineral e incubadas por 22h a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada (Figura 10). É importante destacar que a placa de Petri, contendo as gotas com seus respectivos tratamentos, foi preparada com pelo menos duas horas de antecedência para permitir a estabilização do pH do meio BotuFIV IVM®, em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada.

Tabela 2. Preparação, diluição do estoque e obtenção da concentração final dos antioxidantes para adição nos meios de MIV contendo oócitos bovinos provenientes de ovários coletados em um frigorífico abatedouro em Uberaba-MG.

Substâncias	Diluentes	Estoques ^a	MIV
<i>Moringa oleifera</i> 50 (M50)	Água	0,01 g/mL ^b	50 µg/mL – 0,5 µL ^c
<i>Moringa oleifera</i> 100 (M100)	Água	0,01 g/mL ^b	100 µg/mL – 1,0 µL ^c
<i>Moringa oleifera</i> 150 (M150)	Água	0,01 g/mL ^b	150 µg/mL – 1,5 µL ^c
Vitamina C (controle positivo)	Água	0,01 g/mL	50 µg/mL – 0,5 µL ^c

^aAs soluções ‘estoque’ foram aliquotadas em microtubos e armazenadas à - 20 °C por seis meses.

^bA solução estoque da *Moringa oleifera* foi a mesma para as diferentes concentrações, variando apenas o volume pipetado no meio de maturação *in vitro* (MIV).

^cVolume pipetado do estoque que foi transferida para as gotas de MIV (q.s.p.).

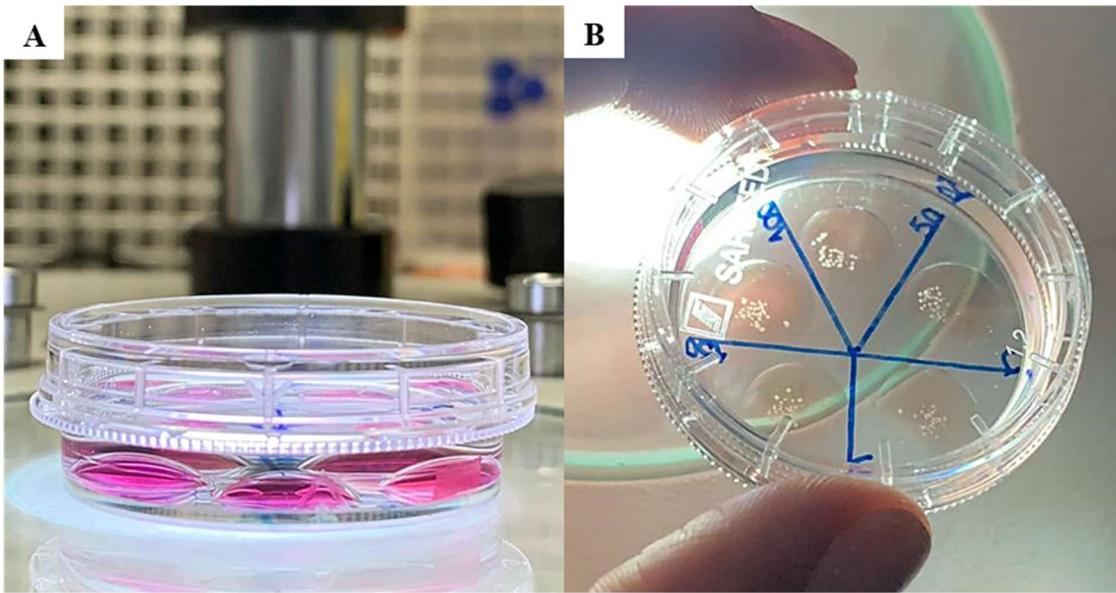


Figura 10. Placa de Petri de 30 mm com gotas de 100 µL contendo seus respectivos tratamentos (M0, M50, M100, M150 e VITC). **A.** Placa de Petri preparada com duas horas de antecedência para permitir a estabilização do pH do meio BotuFIV IVM®, juntamente com seus respectivos tratamentos, em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. **B.** Notar meio já estabilizado contendo os oócitos divididos entre os cinco grupos, prontos para a MIV em estufa a 38,5 °C, com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, por 22 horas.

2.4. Experimento I: Avaliação das células do cumulus e da maturação nuclear

Após 22h de MIV, com auxílio de um estereomicroscópio, os complexos *cumulus oophorus* (CCO's) foram avaliados quanto a expansão das células do *cumulus*. Aqueles que se encontravam expandidos e/ou mucificados foram considerados maduros. Para avaliação da viabilidade celular, as células do *cumulus* expandidas foram removidas com hialuronidase tipo II (1 mg/mL) (H2126- Sigma- Aldrich® Corporation, St. Louis, EUA) e sucessivas pipetagens. Em seguida, a suspensão celular obtida foi corada com trypan blue (0,2 %) (T8154- Sigma-Aldrich® Corporation, St. Louis, EUA) transferida para a câmara de Neubauer, coberta com lamínula e visualizada em microscópio óptico em aumento de 40 vezes. Todas as células presentes nos 4 quadrantes externos foram contadas, sendo que as células coradas em azul foram classificadas como não viáveis e as não coradas como viáveis, como descrito por Santos et al., (2019).

Tal avaliação foi realizada em todas as 21 rotinas destinadas a avaliação da maturação nuclear, quantificação dos níveis de EROs intracelular e avaliação do potencial de membrana mitocondrial e maturação citoplasmática.

Para a maturação nuclear, foram realizadas dez rotinas para avaliar a maturação nuclear dos oócitos para todos os 5 grupos experimentais. Após 22 h de MIV, realizou-se o desnudamento dos oócitos, como citado no item 2.4. Em seguida, os oócitos foram lavados em gotas de 100 µL contendo PBS com 1% de BSA e, posteriormente, foram transferidos para placas de cultivo com cinco poços (WTA, Cravinhos, Brasil), com cada poço contendo 500 µL

de Hoechst 33342 (10 µg/mL) (B2261- Sigma- Aldrich® Corporation, St. Louis, EUA). Essas amostras foram incubadas no escuro, em estufa a 38,5 °C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, por 30 minutos. Após a incubação, os oócitos foram lavados em PBS/BSA transferidos para lâminas de vidro e visualizados em microscópio invertido de epifluorescência (EVOS FL; Invitrogen, Massachusetts, EUA), com um filtro de excitação de 346 nm e emissão de 460 nm, em aumento de 40 x. Por fim, os oócitos foram classificados quanto à presença de vesícula germinativa (VG), quebra da vesícula germinativa (QVG), metáfase I (MI), anáfase I/telofase I (AI/TI), metáfase II (MII) e degenerados/ não identificados (D/NI). Os estágios VG e QVG foram considerados imaturos, MII com extrusão do primeiro corpúsculo polar foi considerado maduro, enquanto os estágios MI, AI/TI foram classificados como intermediários. Por fim, os considerados como D/NI foram aqueles que não puderam ser classificados e/ou encontravam-se degenerados, como descrito por Santos et al., (2019).

2.5. Experimento II: Maturação citoplasmática e avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Foram realizadas seis rotinas de MIV com todos os 5 grupos experimentais para avaliar a maturação citoplasmática e o $\Delta\Psi_m$ usando a coloração MitoTracker Red® (CMXRos M7512, Invitrogen, Califórnia, USA). Após 22 h de MIV, os oócitos foram lavados duas vezes em PBS, desnudados conforme descrito no item 2.4., e então incubados em placas de Petri com cinco poços contendo 500 µL de 0,5 µM de MitoTracker Red®, como descrito por Santos et al. (2019). Em seguida, foram incubados no escuro, em estufa a 38,5 °C, com 5 % de CO₂ em ar e umidade saturada, por 30 minutos. Após a incubação, os oócitos foram lavados em gotas de 100 µL de PBS contendo 1% BSA, transferidos para lâminas de vidro e visualizados em microscópio invertido de epifluorescência (EVOS FL; Invitrogen, Massachusetts, EUA), utilizando filtro de excitação de 579 nm, emissão de 599 nm e aumento de 40x para avaliação da distribuição mitocondrial e 10x para avaliação de $\Delta\Psi_m$ após MIV.

Os pixels referentes a intensidade do sinal de fluorescência foram identificados e as imagens resultantes foram capturadas e analisadas usando o software ImageJ. Foi registrada a intensidade do sinal de cada oótipo, além de ser avaliada a intensidade do sinal em 15 áreas sem oócos para determinar o nível do sinal de fundo, denominado como “background”. Nesta análise, a intensidade de fluorescência foi utilizada como indicador do potencial de membrana mitocondrial, sendo que uma maior intensidade foi associada a um $\Delta\Psi_m$ mais elevado.

Além disso, os oócos marcados foram avaliados para determinar a maturação citoplasmática com base na distribuição das mitocôndrias. Foram classificadas em distribuição

periférica (oócitos imaturos), distribuição dispersa (oócitos maduros) e mitocôndrias em transição (com distribuição periférica e dispersa- oócitos parcialmente maduros), conforme descrito por Sá et al., 2019.

Outro critério para avaliação foram os padrões de organização mitocondrial, seguindo a classificação proposta por Piras et.al (2018). O padrão “A” caracterizava-se por uma estrutura fina, homogênea e com pequenas granulações espalhadas pelo citoplasma. Enquanto o padrão “B”, apresentava um aglomerado heterogêneo, com grandes granulações espalhadas por todo o citoplasma ou concentradas em domínios citoplasmáticos específicos. Entre esses padrões, o padrão “B” foi associado a índices de maturação mais elevados.

2.6. Experimento III: Quantificação dos níveis de EROS intracelular pelo ensaio de diclorofluoresceína

Foram conduzidas cinco rotinas de MIV com todos os 5 grupos experimentais para avaliação de ROS intracelular com 2’7’- diacetato de diclorofluoresceína (H₂DCFDA D6883- Sigma- Aldrich® Corporation, St. Louis, EUA). Após o período de 22 h de MIV, os oócitos foram submetidos a duas lavagens em gotas de 100 µL contendo PBS, seguido pelo processo de desnudamento conforme descrito no item 2.4. Posteriormente, os oócitos foram incubados em placas de Petri com cinco poços, cada um contendo 500 µL de 5 µM da sonda fluorescente 2’7’- diacetato de diclorofluoresceína. Essa sonda foi preparada dissolvendo-se 0,003 g do pó em 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) para o preparo da solução estoque a uma concentração de 500 µM e, posteriormente, dilui-se a mesma em PBS para a obtenção da solução de trabalho a uma concentração de 5 µM, conforme previamente descrito por Santos et al. (2019).

Após 30 minutos de incubação, no escuro, em estufa a 38,5 °C e 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, os oócitos foram lavados duas vezes em gotas de 100 µL de PBS contendo 1 % de BSA. Em seguida, foram transferidos para lâminas de vidro e visualizados em microscópio invertido de epifluorescência (EVOS FL; Invitrogen, Massachusetts, EUA), com um filtro de excitação de 504 nm, emissão de 529 nm e aumento de 10x.

Os pixels referentes a intensidade dos sinais de fluorescência foram identificados e as imagens resultantes foram capturadas e analisadas usando o software ImageJ. Foi registrada a intensidade do sinal de cada oócyto, além de ser avaliada a intensidade do sinal em 15 áreas sem oócitos para determinar o nível do sinal de fundo, denominado como “background”. Esse valor foi subtraído dos dados obtidos para cada oócyto, sendo que um aumento na intensidade de fluorescência está associado a um maior o conteúdo intracelular de EROS.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento seguiu um delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial 5x1, com cinco grupos experimentais (M0, M50, M100, M150 e VITC) e um momento de avaliação (após a maturação *in vitro*). Foram analisados os seguintes parâmetros: expansão dos COCs, viabilidade das células do cumulus, maturação nuclear, distribuição mitocondrial, $\Delta\Psi_m$ e níveis de EROs.

Todos os dados foram expressos em média \pm erro padrão (EP). Para expansão e viabilidade das células do cumulus, utilizou-se o teste Qui-quadrado, com comparações adicionais pelo teste exato de Fisher em caso de diferenças significativas. Para a maturação nuclear, os percentuais de oócitos em diferentes estágios foram submetidos ao mesmo procedimento.

Quanto a distribuição mitocondrial (periférica, dispersa e transição), esta foi avaliada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunn para comparações múltiplas entre os grupos. Já com relação aos padrões de distribuição A e B, realizou-se apenas o teste Qui-quadrado.

Para o $\Delta\Psi_m$ e os níveis de EROs, o valor de cada leitura da fluorescência do oóbito foi obtido, subtraído da média do background e avaliado quanto à normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Como os dados não apresentaram distribuição Gaussiana, realizou teste de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste de Dunn para comparações múltiplas entre os grupos. Esses dados também são apresentados em média \pm erro padrão (EP).

Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA), com nível de confiança de 95%.

4. RESULTADOS

Foram utilizados um total de 594 ovários para obter 3120 oócitos imaturos viáveis. Isso resultou em uma média de 5,26 oócitos viáveis por ovário, os quais foram distribuídos entre as avaliações.

4.1. Experimento I: Efeitos da Moringa oleífera na expansão e na viabilidade das células do cumulus e na maturação nuclear de oócitos bovinos

Nenhuma diferença significativa foi observada entre os grupos nas análises de expansão das células do *cumulus*. Já na análise da viabilidade das células do *cumulus*, o grupo VITC apresentou a maior a viabilidade ($54,86 \pm 4,54$), sendo significativamente superior aos grupos M0 ($43,63 \pm 4,31$), M50 ($37,24 \pm 4,71$), M100 ($36,94 \pm 4,73$) e M150 ($34,54 \pm 4,98$) ($p < 0,0001$).

Na comparação dos demais grupos a viabilidade das células do cumulus não foi diferente entre os grupos M50 e M100 ($p > 0,05$) e diferiu na comparação entre os demais grupos (Tabela 3.)

Nos resultados obtidos do efeito da *Moringa oleifera* na maturação nuclear (média ± erro padrão), observou-se que as concentrações de 50 µg/mL (39,51 ± 6,05), 150 µg/mL (38,89 ± 6,19) e vitamina C 50 µg/mL (39,44 ± 5,73) aumentaram ($p < 0,05$) o percentual de óocitos que atingiram o estágio de MII (Figura 11) em comparação ao grupo controle e M100 (Tabela 3).

Tabela 3. Influência da *Moringa oleifera* após 22 horas de maturação *in vitro*, óocitos bovinos provenientes de ovários de frigorífico abatedouro analisados quanto à expansão dos CCOs por inspeção visual, viabilidade celular do cumulus por coloração com *Trypan blue* e maturação nuclear por marcação com Hoechst (média ± EP).

GRUPOS	CCO's EXPANDIDOS, %	CCO's VIÁVEIS, %	MATURAÇÃO NUCLEAR-ÓCITOS EM MII, %
M0 (-)	99,66 ± 0,04 (587/589)	43,63 ± 4,31 (17126/39168) ^A	29,32 ± 2,99 (76/270) ^A
M50	99,57 ± 0,06 (587/589)	37,24 ± 4,71 (12068/36015) ^B	39,51 ± 6,05 (101/259) ^B
M100	99,84 ± 0,03 (583/585)	36,94 ± 4,73 (12643/37262) ^B	33,46 ± 6,44 (96/289) ^{A,B}
M150	99,69 ± 0,04 (597/599)	34,54 ± 4,98 (8460/27553) ^C	38,89 ± 6,19 (107/279) ^B
VITC (+)	99,55 ± 0,06 (601/604)	54,86 ± 4,54 (14354/26107) ^D	39,44 ± 5,73 (111/282) ^B

* Letras diferentes na mesma coluna evidenciam diferença significativa ($p < 0,05$, Teste Qui-quadrado). MII- Metáfase II. (-) controle negativo. (+) controle positivo.

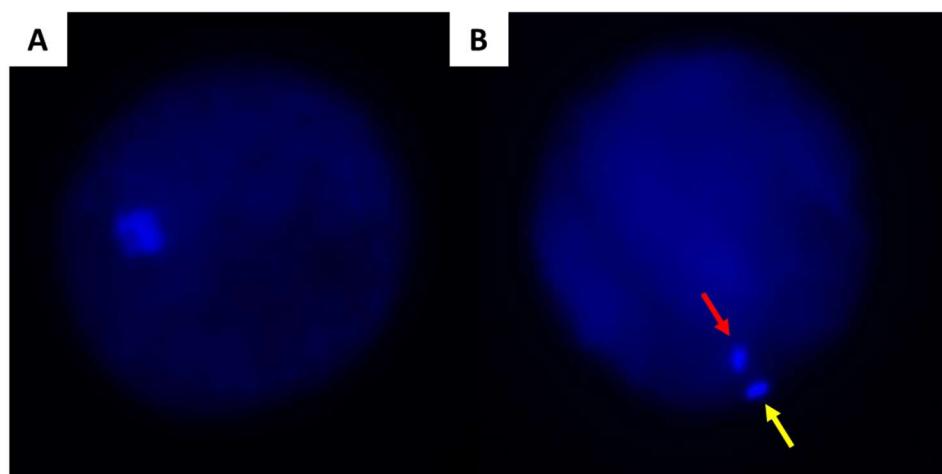


Figura 11. Microscopia de epifluorescência demonstrando avaliação da maturação nuclear de óocitos bovinos provenientes de ovários de frigorífico abatedouro, por meio de marcação com Hoechst, após 22 horas de MIV. **A.** Óocito imaturo em estágio de vesícula germinativa. **B.** Óocito maduro em metáfase II, evidenciando o núcleo (seta vermelha) e a extrusão do 1º corpúsculo polar (seta amarela). Aumento 40x.

4.2. Experimento II: Efeitos da *Moringa oleifera* na maturação citoplasmática de óocitos bovinos por meio da avaliação de distribuição mitocondrial e nos níveis de potencial de membrana mitocondrial ($\Delta \Psi_m$) em óocitos bovinos

Não foram observadas diferenças significativas na distribuição mitocondrial periférica, em transição ou dispersa (Tabela 4, Figura 12), assim como nos padrões de distribuição mitocondrial A e B.

Tabela 4. Efeito da *Moringa oleifera* na maturação citoplasmática de oócitos bovinos provenientes ovários de frigorífico abatedouro. Os oócitos, após 22 horas de maturação in vitro, foram quanto à distribuição mitocondrial e seus padrões, utilizando MitoTracker Red® (média ± EP), controle positivo (VITC) e negativo (sem antioxidante).

GRUPOS	Nº OÓCITOS	DISTRIBUIÇÃO MITOCONDRIAL, %		
		PERIFÉRICO	TRANSIÇÃO	DISPERSA
M0 (-)	156	15,00±1,69 (24)	33,32±1,29 (51)	51,68±0,71 (81)
M50	172	11,08±1,98 (17)	31,31±1,78 (53)	57,61±1,41 (102)
M100	158	9,84±2,88 (16)	35,49±1,74 (55)	54,67±2,11 (87)
M150	154	8,50±2,11 (13)	35,64±1,92 (57)	54,86±1,65 (84)
VIT C (+)	166	16,30±2,42 (28)	31,29±1,61 (52)	52,41±1,27 (86)
PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO MITOCONDRIAL, %				
GRUPOS	Nº OÓCITOS	PADRÃO A	PADRÃO B	
M0 (-)	157	50,11 ± 1,20 (79)	49,89 ± 1,20 (78)	
M50	172	49,09 ± 0,93 (83)	50,91 ± 0,93 (89)	
M100	158	53,25 ± 1,24 (83)	46,75 ± 1,24 (75)	
M150	154	51,99 ± 1,09 (79)	48,01 ± 1,09 (75)	
VIT C (+)	166	57,40 ± 1,75 (95)	42,60 ± 1,75 (71)	

* Letras diferentes na mesma coluna evidenciam diferença significativa ($p < 0,05$, Distribuição mitocondrial- Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn; Padrões de distribuição- Teste Qui-quadrado). (-) controle negativo. (+) controle positivo.

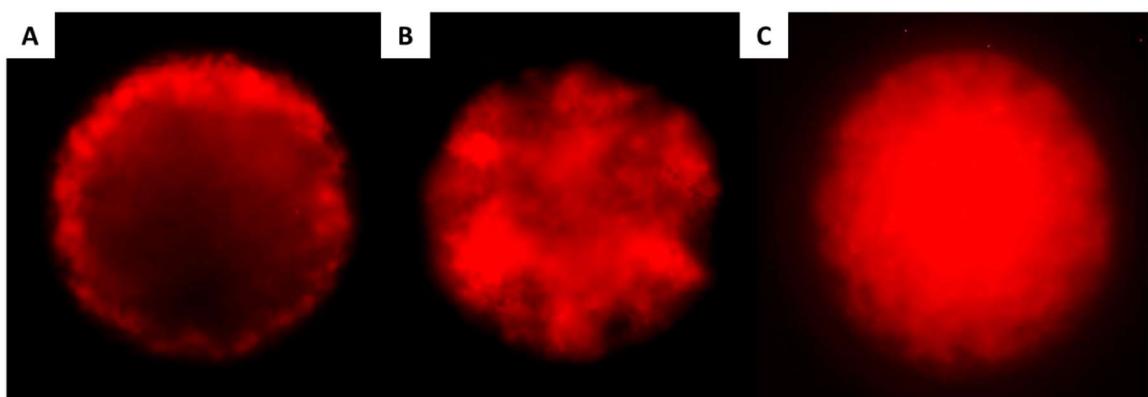


Figura 12. Imagens fluorescentes de oócitos bovinos provenientes de ovários de frigorífico abatedouro, corados com MitoTracker Red® após 22 horas de maturação *in vitro*. A distribuição mitocondrial foi avaliada em diferentes grupos tratados com antioxidantes, *Moringa oleifera* (50, 100 e 150 µg/mL) e da vitamina C (50µg/mL). As imagens ilustram: A. Mitocôndrias com distribuição periférica; B. Mitocôndrias em transição; C. Mitocôndrias dispersas pelo citoplasma.

Considerando os resultados ao avaliar o $\Delta\Psi_m$, observou-se que os grupos M0 ($764979,94 \pm 30040,27$) e M50 ($653863,25 \pm 29111,01$) apresentaram maior intensidade de marcação (Figura 13A, C), indicando um potencial mitocondrial mais elevado em comparação aos demais grupos M100 ($558955,74 \pm 32343,45$), M150 ($488607,93 \pm 27655,02$) e VITC ($549462,37 \pm 28787,58$).

4.3. Experimento III: Efeito da *Moringa oleifera* nos níveis EROs intracelular em oócitos bovinos

Os valores de intensidade de pixels observados pela quantificação dos níveis de EROs intracelular pelo ensaio de H₂DCFDA para os grupos M0, M50, M100, M150 e VIT C foram

de $119380,44 \pm 15410,21$; $66956,98 \pm 6447,01$; $105756,83 \pm 12256,55$; $108862,93 \pm 13982,04$; $86337,00 \pm 10673,50$, respectivamente. Observou-se que os grupos M50 e VIT C apresentaram menor intensidade de marcação, evidenciando uma menor presença de EROs (Figura 13B, D).

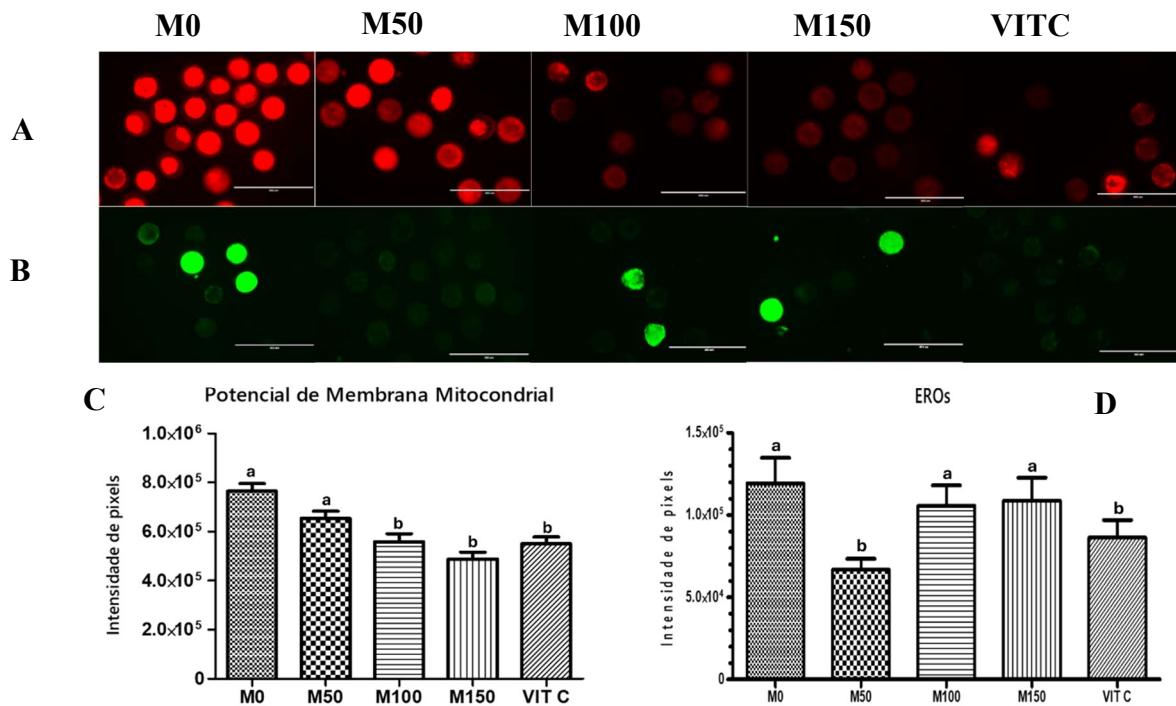


Figura 13. Intensidade de fluorescência de espécies reativas de oxigênio (EROs) e potenciais de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$) em oócitos bovinos provenientes de ovários de frigorífico abatedouro após 22 horas de maturação *in vitro* na presença de *Moringa oleifera* (50, 100 e 150 $\mu\text{g/mL}$) e de vitamina C (50 $\mu\text{g/mL}$). **A.** Oócitos marcados com MitoTracker Red® para quantificação do $\Delta\Psi m$. M0 ($n = 158$); M50 ($n = 165$); M100 ($n = 159$); M150 ($n = 168$); VITC ($n = 170$). **B.** Imagens fluorescentes representativas de oócitos marcados com H2DCFDA para quantificação de EROs. M0 ($n = 163$); M50 ($n = 155$); M100 ($n = 165$); M150 ($n = 176$); VITC ($n = 195$). **C.** Quantificação da intensidade de fluorescência relativa ao $\Delta\Psi m$. **D.** Quantificação da intensidade de fluorescência relativa a EROs. As figuras expressão a média da intensidade de pixels \pm EP. Letras diferentes nas colunas evidenciam diferenças significativas ($p < 0,001$; Teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de Dunn).

5. DISCUSSÃO

As células do *cumulus* desempenham um papel crucial no desenvolvimento e na maturação oocitária, sendo a expansão dessas células um marcador importante da competência do oóbito para o desenvolvimento embrionário (Eppig, 1982; Nevoral et al., 2014). No presente estudo, apesar da ausência de diferença significativa entre os grupos experimentais, observou-se que todos os grupos apresentaram excelentes resultados de expansão, com uma média de 99,66 %, sugerindo assim que a moringa preservou a competência das células do *cumulus*. Morais et al. (2023) relataram resultados semelhantes, com 89 % dos CCO's exibindo expansão celular completa após a MIV, sem diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Ademais, Aquino et al., (2023) observaram que o tratamento com antioxidantes melhorou significativamente as taxas de expansão das CCO's.

Já a viabilidade das células do *cumulus* foi significativamente afetada pela adição de antioxidantes do extrato da *Moringa olífera*. A VITC apresentou viabilidade celular superior, aos demais grupos, sugerindo que a eficácia antioxidante pode depender da composição do meio. O segundo grupo com melhor viabilidade foi o M0, indicando que o ambiente sem aditivos foi capaz de manter um equilíbrio ideal para a viabilidade celular. Por outro lado, os três grupos suplementados com *Moringa oleifera* apresentaram menor viabilidade celular. No entanto, ao considerar apenas esses grupos, o M50 teve a maior viabilidade, enquanto o M150 apresentou a menor, indicando que concentrações mais elevadas podem ser tóxicas. Esse efeito foi relatado por Oliveira et al. (2021), que observaram a redução da viabilidade celular em resposta a altas concentrações do antioxidante eugenol. Esses achados reforçam a importância da otimização das doses de antioxidantes para preservar a viabilidade celular durante a maturação oocitária, uma vez que sua manutenção está diretamente relacionada à qualidade e competência dos óócitos (Santos et al., 2019).

Em relação à maturação nuclear, Barakat et al. (2015) observaram progressão da meiose em óócitos de ovelhas tratados com diferentes concentrações do extrato de *M. oleifera*, comparados a grupos sem aditivos. De forma semelhante, o presente estudo demonstrou um aumento significativo nas taxas de maturação nuclear nos grupos tratados com 50 µg e 150 µg/mL do extrato de moringa, embora tal efeito não tenha sido verificado no grupo tratado com 100 µg/mL. Uma hipótese para essa discrepância é um possível efeito dose-dependente, no qual menores (50 µg) e maiores (150 µg) proporcionam respostas mais eficazes, enquanto a dose intermediária de 100 µg, possivelmente, não atinja o nível suficiente para gerar o estímulo ideal. Outra possibilidade é que a concentração de 100 µg tenha alterado a proporção de compostos bioativos presentes no extrato, resultando em uma composição menos eficaz para influenciar o processo de maturação. Estudos adicionais seriam necessários para explorar essas hipóteses, avaliando a composição do extrato e testando outras concentrações.

Ademais, observou-se um aumento nas taxas de óócitos que atingiram a MII nos grupos tratados com 50 µg/mL de vitamina C. Em contraste, estudos como os de Kere et al. (2013), Dalvit et al. (2005) e Sovernigo et al. (2017), indicam que a vitamina C não influencia as taxas de maturação oocitária. Por outro lado, pesquisas de Tao et al., (2004, 2010) demonstraram que a suplementação com vitamina C durante a maturação de óócitos suínos elevou significativamente as taxas de desenvolvimento até a MII.

Embora alguns estudos, como os citados acima, indiquem que a vitamina C não altera a taxa de óócitos que atingem a fase de MII, outros sugerem que a suplementação pode contribuir para o controle do estresse oxidativo durante a MIV, além de favorecer o desenvolvimento

embrionário subsequente (Wang et al., 2002; Hu et al., 2012; Sovernigo et al., 2017; Wang et al., 2024).

Essas divergências entre os estudos sugerem que a eficácia do controle positivo, vitamina C, na maturação oocitária pode depender de diversos fatores, como a composição do meio de cultivo, especialmente considerando que meios de cultivo comerciais, como o utilizado neste estudo, possuem formulações cuja composição específica é frequentemente mantida sob sigilo comercial, o que pode implicar em variações nas concentrações de nutrientes e outros componentes essenciais, afetando a ação da vitamina C. É possível considerar que meios ricos em componentes endógenos, adicionados pelo fabricante, podem reduzir a necessidade de suplementação adicional de vitamina C, enquanto meios menos enriquecidos podem permitir uma ação mais pronunciada dessa vitamina (Ambrogi et al., 2017).

Outros fatores, como a qualidade e o estágio de desenvolvimento dos oócitos, também desempenham um papel importante. Oócitos em diferentes fases da maturação ou expostos a diferentes níveis de estresse oxidativo podem responder de maneira variável à suplementação com vitamina C. Além disso, as condições de cultivo, como temperatura, pH, oxigenação, tempo de exposição, idade da fêmea, tempo de transporte ovariano, método de aspiração e suplementação influenciam diretamente o metabolismo oocitário (Takenaka et al., 2007; Ciray et al., 2009; Will et al., 2011; Wang et al., 2024). No entanto, no presente estudo, todos os grupos experimentais foram conduzidos concomitantemente em cada rotina, garantindo que essas variáveis impactassem os tratamentos de forma uniforme.

No que diz respeito a distribuição mitocondrial, esta é reconhecida como um parâmetro-chave para a maturação citoplasmática, sendo essencial na produção de ATP, que apoia a maturação oocitária, fertilização e desenvolvimento embrionário (Reynier et al., 2001; Tarazona et al., 2006; Munakata et al., 2016). Durante a maturação, as mitocôndrias migram da periferia para uma distribuição dispersa nos oócitos maduros, acompanhando o aumento da demanda energética e contribuindo para a competência oocitária (Hyttel et al., 1986; Dadarwal et al., 2015; Zhao et al., 2017). Embora este estudo não tenha identificado diferenças significativas entre os grupos experimentais, a prevalência de mitocôndrias em transição e dispersas sugere que o ambiente de maturação forneceu condições adequadas para a maturação citoplasmática. No entanto, ressalta-se, que embora a distribuição mitocondrial seja um marcador relevante, ela representa apenas um dos aspectos da maturação oocitária. Portanto, a inclusão de outras análises, como a quantificação de ATP, a expressão de genes associados à competência oocitária e a avaliação das taxas de fertilização e clivagem, poderia complementar esses achados e fornecer uma visão mais abrangente.

Adicionalmente, mesmo sem diferenças significativas, este estudo contribui para a compreensão da resposta mitocondrial aos tratamentos antioxidantes. A ausência de efeitos prejudiciais em todos os grupos analisados é, igualmente, um achado relevante, indicando que os antioxidantes aplicados não comprometeram a maturação citoplasmática, um aspecto essencial para os sistemas de FIV. Resultados semelhantes foram observados por Ambrogi et al. (2017) e Santos et al. (2019). Por outro lado, Cajas et al. (2020) observaram que a adição do antioxidante nobiletina ao meio MIV aumentou a migração mitocondrial, destacando o potencial impacto de antioxidantes específicos nesse processo.

Além de sua função essencial na maturação citoplasmática, as mitocôndrias desempenham um papel central na geração e manutenção do $\Delta\Psi_m$, um parâmetro que reflete a atividade metabólica, a funcionalidade da cadeia respiratória e o equilíbrio redox celular (Zheng et al., 2023). Estudos sobre o $\Delta\Psi_m$ indicam que seu aumento está associado a um desempenho mitocondrial otimizado, refletindo maior atividade metabólica e, consequentemente, favorecendo a competência oocitária. Esse aumento pode estar relacionado a uma maior capacidade energética e à eficiência na produção de ATP, fatores essenciais para a maturação oocitária. Corroborando essas evidências, o presente estudo identificou um aumento no $\Delta\Psi_m$ nos grupos tratados, o que pode indicar uma melhora na funcionalidade mitocondrial e, possivelmente, na competência oocitária. Por outro lado, a redução do $\Delta\Psi_m$ tem sido associada a comprometimento energético e a processos apoptóticos (Hua et al., 2012; Rocha-Frigoni et al., 2016; Santos et al., 2022; Zheng et al., 2023).

Ademais, o $\Delta\Psi_m$ desempenha papel crucial na regulação da homeostase de Ca^{2+} , prevenindo sobrecargas iônicas e protegendo a célula contra a apoptose. Também está envolvido no controle da produção de H_2O_2 , cujo acúmulo excessivo pode resultar em estresse oxidativo e comprometer a viabilidade celular (Zhang et al., 2021; Zheng et al., 2023). Dessa forma, a elevação do $\Delta\Psi_m$, como vista no presente estudo, pode ser considerada um indicador positivo, desde que analisada em conjunto com outros fatores, como a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), a ação de antioxidantes e a modulação mitocondrial. No presente estudo, os grupos M0 e M50 apresentaram um $\Delta\Psi_m$ significativamente maior em comparação aos grupos M100, M150 e VITC. A análise da intensidade de marcação de EROS, realizada pela técnica de diclorofluoresceína, revelou que os grupos M50 e VITC exibiram menores acúmulos de EROS. Embora a vitamina C tenha mostrado um efeito antioxidante relevante, reduzindo a produção de EROS de maneira similar ao observado por Sovernigo et al. (2017), essa ação não foi acompanhada por um aumento no $\Delta\Psi_m$, ao contrário do efeito verificado no grupo M50 do presente estudo.

Esses achados sugerem que a suplementação com *Moringa oleifera*, na concentração de 50 µg/mL, favoreceu um equilíbrio redox, caracterizado pelos baixos níveis de EROs e pela otimização da atividade mitocondrial, evidenciada pelo aumento no $\Delta\Psi_m$. Acredita-se que os compostos antioxidantes da moringa possam ter estabilizado a cadeia transportadora de elétrons, minimizando o vazamento de elétrons e, assim, a produção excessiva de EROs. Além disso, essa concentração pode ter potenciado mecanismos antioxidantes endógenos, como a superóxido dismutase (SOD) e a glutatona (GSH), auxiliando na regulação do estresse oxidativo sem comprometer a funcionalidade mitocondrial. Como demonstrado no estudo de Duranti et al. (2021), o extrato de *Moringa oleifera*, em um estudo *in vitro* com células musculares esqueléticas humanas, foi capaz de aumentar a atividade de sistemas antioxidantes endógenos em células submetidas a estresse mitocondrial, indicando clara modulação positiva da função mitocondrial. Esses resultados reforçam a hipótese de que o extrato deste estudo favorece um ambiente celular com equilíbrio redox e atividade mitocondrial preservada ou até otimizada.

Por outro lado, os grupos M100 e M150 apresentaram redução no $\Delta\Psi_m$ associada a elevados níveis de EROs, sugerindo um possível efeito dose-dependente. O excesso de *Moringa oleifera* pode ter ativado vias de resposta ao estresse, incluindo a via mitocondrial da apoptose, resultando em um efeito pró-oxidante. Esse padrão foi observado por Hang Do et al. (2020), em um estudo com extrato de *Moringa oleifera* aplicado a células de melanoma, no qual a indução a apoptose foi atribuída ao aumento na produção de EROs e à diminuição do $\Delta\Psi_m$. Para confirmar essa hipótese no presente estudo, seria necessário avaliar a expressão de marcadores associados à apoptose mitocondrial, para determinar se a redução do $\Delta\Psi_m$ representa uma resposta fisiológica adaptativa ou indicativo de apoptose. Além disso, a análise dos níveis de ATP poderia fornecer informações cruciais sobre a eficiência do metabolismo mitocondrial, diferenciando um estado bioenergético funcional de uma possível falha metabólica.

Investigações adicionais que avaliem a atividade da SOD e GSH, o incremento da expressão de mecanismos relacionados ao metabolismo mitocondrial e a quantificação direta de espécies reativas, seriam essenciais para validar essas hipóteses.

6. CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos, concluiu-se que a suplementação do meio de maturação *in vitro* de óócitos bovinos com o extrato hidroalcóolico de *Moringa oleifera*, na concentração de 50 µg/mL, favorece a maturação nuclear oocitária sem comprometer viabilidade das células

do *cumulus*. Além disso, promove um ambiente redox equilibrado, evidenciado pela diminuição dos níveis de EROs e pela otimização da função mitocondrial, refletida pelo aumento no $\Delta\Psi_m$. Acrescenta-se a isso que, por se tratar de um composto natural derivado de uma planta amplamente disponível no Brasil, a *Moringa oleifera* apresenta potencial para reduzir os custos da técnica, tornando-a uma alternativa viável e sustentável na produção *in vitro* de embriões bovinos.

No entanto, concentrações mais elevadas demonstraram efeito deletério, destacando a necessidade de otimizar as doses empregadas. Estudos adicionais, incluindo a avaliação da produção de ATP, expressão de genes associados ao metabolismo mitocondrial e marcadores de apoptose, são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos e consolidar o uso da moringa como um suplemento antioxidante na maturação *in vitro* de oócitos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio concedido financeiro concedido por meio do projeto APQ 01203-23, pelo Programa de Apoio à Pós-Graduação (PAPG-FAPEMIG) e pelo Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC-FAPEMIG)

Nossos agradecimentos se estendem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido por meio do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC-CNPq). E a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro concedido por meio do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares (CAPES-Prosup) e ao Programa de Desenvolvimento da Pós-Graduação Emergencial de Consolidação Estratégica dos Programas de Pós-Graduação *stricto sensu* acadêmicos (CAPES-PDPG 3/4).

Agradecemos ainda pelo suporte financeiro proveniente do Programa Institucional de Apoio a Pesquisa da Universidade de Uberaba (PAPE-Uniube).

Todos esses auxílios tornam os nossos estudos possíveis e nos faz muito gratos.

REFERÊNCIAS

Ambrogi, M; Dall'Acqua, PC; Rocha-Frigoni, NAS; Leão, BCS; Mingoti, GZ. Transporting bovine oocytes in a medium supplemented with different macromolecules and antioxidants: Effects on nuclear and cytoplasmic maturation and embryonic development *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, n.3, p.409-421, 2017.

Aquino, LVA; Santos, MVO; Oliveira, LRM; Moura, YBF; Nascimento, TL; Bertini, LM; Pereira, AF. Antioxidant effects of *Citrus sinensis* peel essential oil in a bovine oocyte model. **Livestock Science**, v.276, 105324, 2023.

Barakat, IAH; Khalil, WKB; Al-Himaidi, AR. Moringa oleifera extract modulates the expression of fertility related genes and elevation of calcium ions in sheep oocytes. **Small Ruminant Research**, v.130, p.67-75, 2015.

Baruselli, PS; Catussi, BLC; Abreu, LA; Elliff, FM; Silva, LG; Batista, EOS. Challenges to increase the AI and ET markets Brazil. **Proceedings of the 33rd Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**, p.1-12, 2019.

Cajas, YN; Beltrán, KC; Guevara, ML; Blanca, MGM; Ramos-Ibeas, P; Gutiérrez-Adán, A; Rizos, D; González, EM. Antioxidant nobiletin enhances oocytes maturation and subsequent embryo development and quality. **International Journal of Molecular Sciences**, v.21, p.1-18, 2020.

Cao, Y; Zhao, H; Wang, Z; Zhang, C; Bian, Y; Liu, X; Zhang, C; Zhang, X; Zhao, Y. Quercetin promotes *in vitro* maturation of oocytes from humans and aged mice. **Cell Death and Disease**, v.11, n.965, p.1-15, 2020.

Cavallari, FC; Leal, CLV; Zvi, R; Hansen, PJ. Effects of melatonin on production of reactive oxygen species and developmental competence of bovine oocytes exposed to heat Shock and oxidative stress during *in vitro* maturation. **Zygote**, v.27, p.180-186, 2019.

Ciray, HN; Aksoy, T; Yaramancı, K; Karayaka, I; Bahcecı, M. *In vitro* culture under physiologic oxygen concentration improves blastocyst yield and quality: a prospective randomized survey on sibling oocytes. **Fertility and Sterility**, v.91, n.4, p.1459-1461, 2009.

Coticchio, G; Canto, MD; Renzini, MM; Guglielmo, MC; Brambillasca, F; Turchi, D; Novaara, PV; Fadini, R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic. **Human Reproduction Update**, v.0, n.0, p.1-28, 2015.

Dadarwal, D; Adams, GP; Hyttel, P; Brogliatti, GM; Caldwell, S; Singh, J. Organelle reorganization in bovine oocytes during dominant follicle growth and regression. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.124, n.13, p.1-11, 2015.

Dalvit, G; Llanes, SP; Descalzo, A; Insani, M; Beconi, M; Cetica, P. Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.40, p.93-97, 2005.

Davoodian, N; Kadivar, A; Mehrban, H. Supplementation of media with gamma-oryzanol as a novel antioxidant to overcome redox imbalance during bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.59, n.1, e14503, 2024.

Dunning, KR; Cashman, K; Russell, DL; Thompson, JG; Norman, RJ; Robker, RL. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. **Biology of Reproduction**, v.83, n.6, p.909-918, 2010.

Dunning, KR; Russell, DL; Robker, RL. Lipids and oocyte developmental competence: The role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v.148, n.1, p.R15-R27, 2014.

Duranti, G; Maldini, M; Cognale, D; Horner, K; Dimauro, I; Sabatini, S; Ceci, R. *Moringa oleifera* Leaf Extract Upregulates Nrf2/HO-1 Expression and Ameliorates Redox Status in C2C12 Skeletal Muscle Cells. **Molecules**, v.26, n.16, p.1-16, 2021.

Eini, F; Bidadkosh, A; Nazarian, H; Piryaei, A; Novin, MG; Joharchi, K. Thymoquinone reduces intracytoplasmic oxidative stress and improves epigenetic modification in polycystic ovary syndrome mice oocytes, during *in vitro* maturation. **Molecular Reproduction & Development**, p.1-14, 2018.

Eppig, JJ. The Relationship between Cumulus Cell-Oocyte Coupling, Oocyte Meiotic Maturation, and Cumulus Expansion. **Developmental Biology**, v.89, p.268-272, 1982.

Ge, H; Tollner, TL; Hu, Z; Dai, M; Li, X; Guan, H; Shan, D; Zhang, X; LV, J; Huang, C; Dong, Q. The importance of mitochondrial metabolic activity and mitochondrial DNA replication during oocyte maturation *in vitro* on oocyte quality and subsequent embryo developmental competence. **Molecular Reproduction & Development**, v.79, p.392-401, 2012.

Gonçalves, PBD; Figueiredo, JR; Freitas, VJF. Produção *in vitro* de embriões. In: **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. 2. Ed. São Paulo: Roca, p.261-291, 2008.

Hang Do, B; Hoang, NS; Nguyen, TPT; Chi Ho, NQ; Long Le, T. Phenolic Extraction of *Moringa Oleifera* Leaves Induces Caspase-Dependent and Caspase-Independent Apoptosis through the Generation of Reactive Oxygen Species and the Activation of Intrinsic Mitochondrial Pathway in Human Melanoma Cells. **Nutrition and Cancer**, v.73, p. 1-20, 2020.

Hua, S; Zhang, H; Song, Y; Li, R; Liu, J; Wang, Y; Quan, F; Zhang Y. High expression of Mfn1 promotes early development of bovine SCNT embryos: Improvement of mitochondrial membrane potential and oxidative metabolism. **Mitochondrion**, v.12, p.320-327, 2012.

Hu, J; Cheng, D; Gao, X; Bao, J; Ma, X; Wang, H. Vitamin C Enhances the *in vitro* Development of Porcine Pre-implantation Embryos by Reducing Oxidative Stress. **Reproduction in Domestic Animals**, v.47, n.6, p.873-879, 2012.

Hyttel, P; Xu, KP; Smith, S; Greve, T. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in cattle. **Journals of Reproduction & Fertility**, v.78, p.615-625, 1986.

IETS. 2023 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. In: **Embryo Technology Newsletter**, v.42, n.4, p.01-15, 2024.

Kere, M; Siriboon, C; Lo, NW; Nguyen, NT; Ju, JC. Ascorbic Acid Improves the Developmental Competence of Porcine Oocytes After Parthenogenetic Activation and Somatic Cell Nuclear Transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, v.59, n.1, p.78-84, 2013.

Korshunov, SS; Skulachev, P; Starkov, AA. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. **FEBS Letters**, v.416, n.1, p.15-18, 1997.

Leite, RF; Annes, K; Ispada, J; Lima, CB; Santos, EC; Fontes, PK; Nogueira, MFG; Milazzotto, MP. Oxidative Stress Alters the Profile of Transcription Factors Related to Early Development on *in vitro* Produced Embryos. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2017, p.1-15, 2017.

Leone, A; Spada, A; Battezzati, A; Schiraldi, A; Aristil, J; Bertoli, S. *Moringa oleifera* seeds and oil: Characteristics and uses for human health. **International Journal of Molecular Sciences**, v.17, p.1-14, 2016.

Munakata, Y; Ichinose, T; Ogawa, K; Itami, N; Tasaki, H; Shirasuna, K; Kuwayama, T; Iwata, H. Relationship between the numbers of cells surrounding oocytes and energy states of oocytes. **Theriogenology**, v.86, p.1789-1798, 2016.

Morais, ANP; Lima, LF; Silva, AFB; Lienou, LL; Ferreira, ACA; Watanabe, YF; Joaquim, DC; Alves, BG; Pereira, AF; Alves, DR; Oliveira, AC; Morais, SM; Magalhães-Padilha, DM; Figueiredo, JR; Gastal, EL. Effect of carvacrol antioxidant capacity on oocyte maturation and embryo production cattle. **Zygote**, v.31, p.173-179, 2023.

Nevoral, J; Orsák, M; Klein, P; Petr, J; Dvráková, M; Weingartová, I; Vyskocilová, A; Zámostná, K; Krejcová, T; Jílek, F. **Scientia Agricultura Bohemica**, v.45, n.4, p.212-225, 2014.

Oliveira, LRM; Aquino, LVC; Santos, MVO; Freitas, VJF; Bertini, LM; Pereira, AF. Effects of different concentrations of eugenol in maturation medium on bovine oocytes, oxidative status and preimplantation embryos. **Animal Production Science**, v.62, n.2, p.142-151, 2021.

Piras, AR; Menéndez-Blanco, I; Soto-Heras, S; Catalá, MG; Izquierdo, D; Bogliolo, L; Paramio, MT. Resveratrol supplementation during *in vitro* maturation improves embryos development of prepubertal goat oocytes selected by brilliant cresyl blue staining. **Journal of Reproduction and Development**, v.65, n.2, p.113-120, 2018.

Reynier, P; May-Panloup, P; Chrétien, MF; Morgan, CJ; Jean, M; Savagner, F; Barrière, P; Malthièry, Y. Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.7, n.5, p.425-429, 2001.

Rocha-Frigoni, NAS; Leão, BCS; Dall'Acqua, PC; Mingoti, GZ. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured *in vitro* with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. **Theriogenology**, v.86, n.8, p. 1897-1905, 2016.

Romek, M; Gajda, B; Krzystofowicz, E; Kucia, M; Uzarowska, A; Smorag, Z. Improved quality of porcine embryos cultures with hyaluronan due to the modification of the mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species level. **Theriogenology**, v.102, p.1-9, 2017.

Sá, NAR; Vieira, LA; Ferreira, ACA; Cadenas, Jesús; Bruno, JB; Maside, F; Alves, BG; Rodrigues, APR; Leal-Cardoso, JH; Gastal, EL; Figueiredo, JR. Anethole Supplementation During Oocyte Maturation Improves *in vitro* Production of Bovine Embryos. **Reproductive Sciences**, v.27, p. 1602, 1608, 2020.

Santos, TA; Shourbagy, SE; John, JCS. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, v.85, n.3, p. 1-8, 2006.

Santos, MVO, Nascimento, LE; Praxedes, EA; Borges, AA; Silva, AR; Bertini, LM; Pereira, AF. *Syzygium aromaticum* essential oil supplementation during *in vitro* bovine oocytes maturation improves parthenogenetic embryonic development. **Theriogenology**, v.128, p.74-80, 2019.

Santos, JC; Marques, CC; Baptista, MC; Pimenta, J; Teixeira, J; Montezinho, L; Cagide, F; Borges, F; Oliveira, PJ; Pereira, RMLN. Effect of a Novel Hydroxybenzoic Acid Bases Mitochondria Directed Antioxidant Molecule on Bovine Sperm Function and Embryo Production. **Animals**, v.804, n.12, p.1-16, 2022.

Sabatini, L; Wilson, C; Lower, A; Al- Shawaf, T; Grudzinskas, G. Superoxide dismutase activity in human follicular fluid after controlled ovarian hyperstimulation in women undergoing *in vitro* fertilization. **Fertility and Sterility**, v.72, n.6, p.1027- 1034, 1999.

Sharma, V; Paliwal, R; Pracheta, Sharma, S. Phytochemical analysis and evaluation of antioxidant activities of hydro-ethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. Pods. **Journal of Pharmacy Research**, v.4, n.2, p.554-557, 2011.

Shkolnik, K; Tadmor, A; Ben-Dor, S; Nevo, N; Galiani, D; Dekel, N. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. **PNAS**, v.108, n.4, p.1462-1467, 2011.

Soto-Heras, S; Paramio, MT. Impacto f oxidative stress on oocyte competence for *in vitro* embryo production programs. **Research in Veterinary Science**, v.132, p.342-350, 2020.

Sovernigo, TC, Adona, PR, Monzani, OS, Guemra, S; Barros, FDA, Lopes, FG; Leal, CLV. 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, n.4, p.561-569, 2017.

Stojkovic, M; Machado, SA; Stojkovic, P; Zakhartchenko, V; Hutzler, P; Gonçalves, PB; Wolf, E. 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 of Reproduction**, v.64, p.904-909, 2001.

Sultana, S. Nutritional and functional properties of *Moringa oleifera*. **Metabolism Open**, v.8, p.1-6, 2020.

Takenaka, M; Horiuchi, T; Yanagimachi, R. Effects of light on development of mammalian zygotes. **PNAS**, v.104, n.36, p.14289-14293, 2007.

Tao, Y; Zhou, B; Xia, G; Wang, F; Fu, M. Exposure to L- Ascorbic Acid or α -Tocopherol Facilitates the Development of Porcine Denuded Oocytes from Metaphase I to Metaphase II and Prevents Cumulus Cells from Fragmentation. **Reproduction in Domestics Animals**, v.39, p.52-57, 2004.

Tao, Y; Chen, H; Tian, NN; Huo, DT; Li, G; Zhang YH; Liu, y; Fang FG; Ding, JP; Zhang, XR. Effects of L-Ascorbic Acid, α -Tocopherol and Co-culture on *in vitro* Developmental

Potential of Porcine Cumulus Cells Free Oocytes. **Reproduction in Domestical Animals**, v.45, p.19-25, 2010.

Vats, S; Gupta, T. Evaluation of bioactive compounds and antioxidant potential of hydroethanolic extract of *Moringa oleifera* Lam. From Rajasthan, India. **Physiology and Molecular Biology of Plants**, v.23, p.239-248, 2017.

Wang, X; Falcone, T; Attaran, M; Goldberg, JM; Agarwal, A; Sharma, RK. Vitamin C and Vitamin E supplementation reduce oxidative stress-induced embryo toxicity and improve the blastocyst development rate. **Fertility and Sterility**, v.78, n.6, p.1272-1277, 2002.

Wang, F; Tian, X; Zhang, L; He, C; Ji, P; Li, Y; Tan, D; Liu, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. **Reproductive Science**, v.101, n.2, p.578-586, 2014.

Wang, Y; Wang, A; Liu, H; Yang, R; Zhang, B; Tang, B; Li, Z; Zhang, X. Vitamin C Improves Oocyte *in vitro* Maturations and Potentially Changes Embryo Quality in Cattle. **Veterinary Sciences**, v.11, n.372, p.1-10, 2024.

Will, MA; Clark, NA; Swain, JE. Biological pH buffers in IVF: help or hindrance to success. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.711, n.28, p.711-724, 2011.

Zhang, LY; Lin, M; Qingrui, Z; Zichuan, W; Junjun, L; Kexiong, L; Xiangwei, F; Yupeng, H. Mitochondrial Calcium uniporters are essencial for meiotic progression in mouse oocytes by controlling Ca^{2+} entry. **Cell Proliferation**, v.54, n.11, p.1-13, 2021.

Zhao, XM; Wangm N; Hao, HS; Li, CY; Zhao, YH; Yan, CL; Wang, HY; Du, WH; Wang, D; Liu, Y; Pang, YW; Zhu, HB. Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. **Journal of Pineal Research**, v.64, n.1, p.e12445, 2017.

Zhao, B; Ding, X; Wang, X; Sun, Y; Gao, S; Song, X; Zhang, B; Zhang, Y; Wang, Y. Supplementation with kaempferol relieves oxidative stress and enhances development of early bovine embryos *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.57, p.1007-1015, 2022.

Zheng, L; Luo, Y; Zhou, D; Liu, H; Zhou, G; Meng, L; Hou, Y; Liu, C; Li, J; Fu, X. Leonurine improves bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development by reducing oxidative stress and improving mitochondrial function. **Theriogenology**, v.199, p.11-18, 2023.

Zorova, LD; Popkov, VA; Plotnikov, EY; Silachev, DN; Pevzner, B; Jankauskas, SS; Babenko, VA; Zorov, SD; Balakireva, AV; Juhaszova, M; Sollot, SJ; Zorov, DB. Mitochondrial membrane pontential. **Analytical Biochemistry**, v.552, p.50-59, 2017.

Anexo I: Comitê de Ética em Experimentação Animal**Uniube****Comitê de Ética em Experimentação Animal**

Ofício CEEA-009/2021

Uberaba, 30 de agosto de 2021.

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 009/2021 relativo ao projeto intitulado **“Suplementação com antioxidantes naturais em meios de maturação in vitro de oócitos bovinos”** que tem como responsável o **Prof. Ian Martin**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.794/08.

CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol n° 009/2021 related to the project entitled "**Supplementation with natural antioxidants in means of in vitro maturation of bovine oocytes**", under the supervision of **Prof. Ian Martin**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law n° 11.794/08.

Atenciosamente,



Profa. Joely Ferreira Figueiredo Bittar
Coordenadora do CEEA-UNIUBE