

## EFEITO DE *Morinda citrifolia* NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS

(Effect of *Morinda citrifolia* on in vitro maturation of bovine oocytes)

Naylla Raquel Costa Leite CAMPOS<sup>1</sup>; Breno Glaessner Gomes Fernandes de SOUZA<sup>1</sup>;  
Hélder Moraes PEREIRA<sup>2</sup>; Ana Lúcia ABREU-SILVA<sup>2</sup>; Sérgio Henrique COSTA  
JÚNIOR<sup>1</sup>; Fernando ALMEIDA SOUZA<sup>1,3</sup>; Larissa Sarmiento dos Santos  
RIBEIRO<sup>2</sup>; Felipe de Jesus MORAES JÚNIOR<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Cidade  
Universitária Paulo VI, Av. Lourenço Vieira da Silva, 1000. Jardim São Cristóvão, São Luís/MA.  
CEP: 65.055-310; <sup>2</sup>UEMA; <sup>3</sup>Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Fundação  
Oswaldo Cruz/RJ. \*E-mail: [moraesjunior@cca.uema.br](mailto:moraesjunior@cca.uema.br)

### RESUMO

A produção *in vitro* (PIV) de embriões é uma biotecnologia que auxilia a produção de animais geneticamente superiores. Contudo, a produção excessiva das espécies reativas de oxigênio por esta técnica resulta em danos celulares aos oócitos e embriões. O uso de antioxidantes durante a PIV pode reduzir o estresse oxidativo. O fruto da *Morinda citrifolia* (noni) pode causar impactos positivos nas taxas de maturação da técnica da PIV devido suas propriedades antioxidantes. Desta forma, este estudo visa avaliar os efeitos do noni sobre os aspectos celulares e moleculares da etapa de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos. Obteve-se um total de 817 complexos *cumulus oophorus* (CCOs) viáveis para a maturação, os quais foram distribuídos de acordo com os seguintes tratamentos com noni: controle, 1mg/mL, 5mg/mL and 10mg/mL. Determinou-se a taxa de oócitos maturados pela técnica Hoescht 33342. Alguns oócitos foram utilizados para mensurar a expressão de genes relacionados a apoptose, ação antioxidante e estresse oxidativo através de qRT-PCR. Foram obtidos poucos oócitos em estágio de vesícula germinativa e rompimento de vesícula germinativa, contudo, obteve-se um grande número de oócitos sem estágio nuclear identificável e degenerados. Não houve diferença para os achados nucleares entre os grupos tratados com noni. A análise molecular revelou diferença entre os grupos experimentais para os genes Bcl-2 e BAX, indicando que o tratamento com noni desempenhou papel importante de proteção antiapoptótica durante a MIV, evidenciado principalmente pela expressão de mRNA do grupo noni 1 mg/mL. Desta forma, os dados da pesquisa indicam que a *M. citrifolia* apresentou efeito antiapoptótico durante maturação *in vitro*.

**Palavras-chave:** Antioxidante, CCOs, *Morinda citrifolia*, noni, produção *in vitro*.

### ABSTRACT

The *in vitro* production (IVP) of embryos is a biotechnology that helps the production of genetically superior animals. However, the excessive production of oxygen-reactive species by this technique results in cellular damage to oocytes and embryos. The use of antioxidants during IVP can reduce oxidative stress. The fruit of *Morinda citrifolia* (noni) may cause positive impacts on the maturation rate of the IVP technique due to its antioxidant properties. Thus, this study aims to evaluate the effects of noni on cellular and molecular aspects in the stage of *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes. A total of 817 viable immature oocytes were obtained, which were distributed according to the following treatments with noni: control, 1mg/mL, mg/mL, and 10mg/mL. The rate of matured oocytes was determined by the Hoescht 33342 technique. Some oocytes were used to measure the expression of genes related to apoptosis, antioxidant action, and oxidative stress through the qRT-PCR technique. Few oocytes in germinal vesicle and germinal vesicle rupture stage were obtained; however, a large number of oocytes without identifiable nuclear stage and degenerated were obtained. There was no difference ~~for~~ in nuclear findings between the groups treated with noni. The molecular analysis revealed differences between the experimental groups for the Bcl-2 and BAX genes, indicating that the treatment with noni played an important role in anti-apoptotic protection during IVM, mainly evidenced by the expression of mRNA from the 1 mg/mL noni group. Therefore, research data indicate that *Morinda citrifolia* had an anti-apoptotic effect during *in vitro* maturation.

**Keywords:** Antioxidant, COCs, *Morinda citrifolia*, noni, *in vitro* production.

## INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotecnologia que vem sendo extensamente aplicada no Brasil e tem se mostrado promissora por elevar a produção de animais geneticamente superiores (GONÇALVES *et al.*, 2007; MELLO *et al.*, 2016).

A Maturação *in vitro* (MIV), uma das etapas da PIV, consiste no crescimento e maturação de oócitos na ausência de fatores originários do ovário e do organismo. Durante esta fase, o oócito sofre diversas transformações tanto em seu citoplasma quanto em seu núcleo, as quais são necessárias para o desenvolvimento das etapas subsequentes (GONÇALVES, 2007).

A MIV possui algumas limitações que precisam ser solucionadas. A produção em excesso das espécies reativas de oxigênio (EROs) é um desses obstáculos e advém das diferentes concentrações de oxigênio encontradas no ambiente atmosférico e intrauterino (FONSECA, 2005). Esse desequilíbrio pode influenciar no processo de maturação oocitária e favorecer a ocorrência de alterações citogenéticas. Para tanto, pesquisas associando substância com propriedades antioxidantes juntamente com os meios de maturação estão sendo realizadas no intuito de minimizar os efeitos adversos que as tensões de oxigênio causam aos oócitos durante o processo de maturação (FONSECA, 2005; SILVA *et al.*, 2011).

A *Morinda citrifolia* (noni) é uma planta de uso milenar que possui diversas propriedades terapêuticas. Seu fruto possui um suco rico em metabólitos que conferem essas propriedades medicinais, que incluem os compostos fenólicos, ácidos orgânicos e alcaloides e dentre os compostos ativos encontrados estão cumarinas, ácidos graxos, flavonoides (quercetina), lignanas, polissacarídeos, iridoides, antraquinonas, terpenoides e esteróis (DENG *et al.*, 2015). Os flavonóides são uma classe de compostos naturais de considerável interesse científico e terapêutico. Eles são um grupo de substâncias naturais com estrutura fenólica variável e possuem ação antioxidante (CHAN-BLANCO *et al.*, 2006). A quercetina, é um flavonoide presente em frutas, vegetais, flores, grãos, e dentre suas propriedades destaca-se a atividade antioxidante (GUEMRA *et al.*, 2013). Trabalhos já puderam elucidar as propriedades antioxidantes presentes em diversos compostos do fruto da *M. citrifolia* (ALMEIDA *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2020), sendo esta característica importante para os eventos fisiológicos envolvidos na maturação oocitária *in vitro* (GUEMRA *et al.*, 2013; GAD *et al.*, 2018).

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

## MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado em reunião do Comitê de Ética e Experimentação Animal em 24/10/2018 para atendimento às normas de Bem-Estar Animal da Resolução CFMV Nº 1000/2012 e Lei 11.794 / 2008. cujo número de aprovação é 20/2018.

### Preparo do suco do fruto de *M. Citrifolia*

Os frutos de *M. citrifolia* usados nesse projeto foram obtidos na Ilha de São Luís, Maranhão, com classificação botânica do Herbário Rosa Mochel, do Departamento de Química e Biologia da Universidade Estadual do Maranhão – UEMA, depositados sob exsicata nº

200046. No Laboratório de Anatomopatologia, do Curso de Medicina Veterinária, os frutos obtidos foram lavados com água destilada, secos com papel toalha e acondicionados em frasco de vidro estéril por dois a três dias para a liberação do sumo. Esse conteúdo foi coletado e centrifugado a 4000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi liofilizado e o pó mantido a 4 °C até o uso (ALMEIDA-SOUZA *et al.*, 2016).

### **Obtenção das amostras e punção folicular**

Os complexos *cumulus oophorus* (CCOs) obtidos foram oriundos de ovários de vacas abatidas no abatedouro municipal D.A. Vital, em São Luís-MA. Esses ovários foram transportados ao laboratório de reprodução animal da UEMA, em recipiente térmico contendo solução tampão salina-fosfato (PBS) a 37 °C suplementado com 1mL de gentamicina (Gentrin<sup>®</sup>, Ourofino Ltda. Brasil; 100mL). No laboratório, os ovários foram lavados com PBS a 37 °C e os CCOs recuperados por aspiração de folículos ovarianos medindo entre 2 a 8mm de diâmetro. Nesse processo, foi utilizado agulha descartáveis 25 x 0,7mm (22G), acoplado a uma seringa de 5mL. O líquido folicular obtido foi depositado em tubo do tipo Falcon em Banho-Maria a 37,5 °C durante 10 minutos para sedimentação.

O conteúdo decantado foi depositado em uma placa de Petri de 100 x 20mm para pesquisa sob lupa estereomicroscópio (NOVA optical systems). Os CCOs foram classificados conforme a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (LEIDFRIED e FIRST, 1979). Somente os CCOs que apresentaram grau I e II foram selecionados e transferidos para placa de Petri 30 x 10mm contendo meio de manutenção TCM 199 1x (Gibco Life Technologies<sup>™</sup>, Brasil Ltda., Itapevi-São Paulo, Brasil; 500mL). Foram realizadas 18 baterias de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, nos quais foram recuperadas 817 estruturas viáveis (graus I e II) para a MIV, sendo estas divididas entre os grupos experimentais.

### **Grupos experimentais**

As amostras de noni liofilizado (375mg/mL) foram diluídas em eppendorfs conforme os tratamentos: 0mg (grupo controle), 1mg/mL (A), 5mg/mL (B) e 10mg/mL (C). Posteriormente, foi adicionado 1mL de meio de maturação (Gene-up Biotecnologia; São Paulo-SP, Brasil; 50mL) aos eppendorfs conforme os tratamentos com *M. citrifolia*. A placa de maturação foi preparada utilizando placa de petri 60 x 15mm, com 4 gotas de 100µL contendo meio de maturação suplementados com noni conforme os tratamentos descritos e recobertos em óleo mineral estéril.

### **Maturação *in vitro***

Os CCOs selecionados foram isolados através da lavagem em microgotas de 50µL contendo meio de manutenção TCM 199 em placas de Petri de 100 x 20mm. Em seguida, foram transferidos para a placa de maturação preparada previamente e colocados em estufa de atmosfera modificada, cuja temperatura de 38,8 °C, em atmosfera gasosa de 5% de CO<sub>2</sub> por 24h, iniciando o processo de maturação *in vitro*.

### **Avaliação dos estágios de maturação nuclear**

A avaliação da maturação nuclear foi feita pela observação dos estágios de meiose dos oócitos após 24 horas de maturação utilizando a técnica de fluorescência Hoescht 33342

(Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil; 100mg). Para retirar as células do *cumulus*, os CCOs foram incubados por 10 minutos em hialuronidase (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil; 0,2%; v/v) e submetidos a um turbilhamento mecânico. Em seguida, os oócitos foram lavados em meio TQC para retirar o excesso de hialuronidase e incluídos em 50µL contendo solução de Hoescht-33342 em placa de petri 60 x 15mm. A visualização do material genético fluorescente em azul foi verificada por microscopia de epifluorescência (filtro de excitação de 365nm e de emissão 420nm). Oócitos em metáfase II foram considerados maduros.

### Extração de RNA e confecção do cDNA

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

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

### PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

**Tabela 01:** Lista de genes utilizados no RT-PCR em tempo real.

Gene	Iniciadores (5'-3')	Produto	Sequência de referência no NCBI	Referência
<b>BAX</b>	GTGCCCCGAGTTGATCAGGAC CCATGTGGGTGTCCCAAAGT	126	NM_17389 4.1	BORUSZEWSKA <i>et al.</i> , 2015
<b>Bcl-2</b>	GAGTTCGGAGGGGTCATGTG GCCTTCAGAGACAGCCAGGA	203	NM_00116 6486.1	BORUSZEWSKA <i>et al.</i> , 2015
<b>Casp3</b>	TGCCACTGTATCAGGGAACA TGCTCAGCACAAACATCACA	192	NM_20110 7726	SAEED-ZIDANE <i>et al.</i> , 2017
<b>CAT1</b>	TGGGACCCAATCTCCAG AAGTGGGTCTGTGTTCCAG	178	NM_00103 5386.1	SAEED-ZIDANE <i>et al.</i> , 2017
<b>SOD1</b>	TGCCATCGTGGATATTGTAG GCAATTCCAATTACACCACA	189	NM_17461 5	SAEED-ZIDANE <i>et al.</i> , 2017
<b>Nrf-2</b>	CCCAGTCTTCACTGCTCCTC TCAGCCAGCTTGTCATTTTG	165	NM_00101 1678	SAEED-ZIDANE <i>et al.</i> , 2017
<b>GAPDH</b>	GAGAAGGCTGGGGCTCACTTG GCTGACAATCTTGAGGGTGTTG	195	NM_00103 4034.2	DAVIES <i>et al.</i> , 2006

A determinação quantitativa dos níveis de transcrição dos genes de interesse, a partir do cDNA, foi feita por PCR em tempo real (qRT-PCR) usando o kit GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) e o termociclador da Applied Biosystems modelo

QuantStudio 3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Os iniciadores usados estão descritos na Tab. 01. Os resultados foram obtidos em valores de limiar de detecção (Ct - *cycle threshold*) com o software QuantStudio™ Design & Analysis v.1.4.3 (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA), e a quantificação relativa expressa por  $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$  usando GAPDH como gene endógeno.

### **Análise estatística**

O delineamento foi ao acaso com 4 tratamentos x 200, dependendo da quantidade de oócitos viáveis por coleta. As variáveis, taxa de maturação e estágios da meiose, foram submetidas ao teste de normalidade. Realizou-se a análise de variância (ANOVA) e os dados qualitativos foram comparados pelo teste do  $\chi^2$ , considerando  $p < 0,05$ . As análises foram executadas utilizando o programa Statistical Analysis System (SAS Institute Inc, 2015). Os dados da expressão de mRNA por RT-PCR foram avaliadas pelo teste Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn para comparação múltipla entre os grupos experimentais. Executadas utilizando o software Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

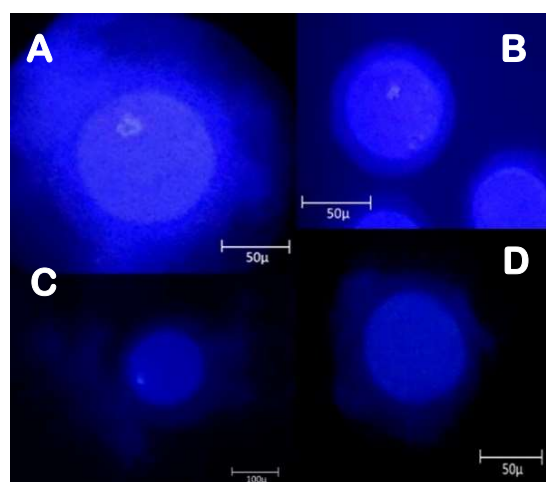
### **Avaliação dos estágios de maturação nuclear**

Os resultados do Hoescht 33342 foram classificados conforme os achados nucleares dos oócitos. O estágio de vesícula germinativa (VG) é caracterizado pela presença de núcleo desenvolvido, porém imaturo. O oócito encontra-se na fase de diplóteno da Prófase I. Estruturas encontradas nesse estágio não obtiveram maturação oocitária. O rompimento da vesícula germinativa (RVG) é caracterizado por estruturas que entraram em metáfase I, onde a vesícula apresenta aspecto fragmentado.

O núcleo é caracterizado como um ponto fluorescente com aspecto granuloso mais próximo ao centro da célula. Por fim, a metáfase II é caracterizada pelo fim da maturação. Estruturas com ponto fluorescente próximo a membrana plasmática estão em MII, portanto, concluíram o processo de maturação (HEWITT e ENGLAND, 1998). A Fig. 01 ilustra os estágios de maturação oocitária.

Uma pequena quantidade de oócitos chegou em estágio de VG e RVG (Tab. 02), indicando que os oócitos iniciaram a meiose, porém não completaram o processo. No entanto, obteve-se um maior número de oócitos sem estágio nuclear identificável e degenerados (NI). Não houve diferença estatística significativa para os achados nucleares entre os grupos tratados com *M. citrifolia*.

O experimento de Santos *et al.* (2002), o qual avaliou a cinética de maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos em quatro tratamentos e diferentes tempos de maturação, obteve menores taxas de oócitos degenerados/ não identificados com tempos de maturação reduzido. Portanto, é necessário realizar mais testes para determinar o tempo ideal para a maturação *in vitro* dos oócitos tratados com *M. citrifolia*, no intuito de aumentar o número de oócitos em MII e diminuir o número de oócitos degenerados.



**Figura 01:** Coloração dos oócitos bovinos com Hoescht 33342 para avaliação dos estágios de maturação.

**Obs.:** Oócitos: A = em estágio de vesícula germinativa; B = em estágio intermediário com rompimento da vesícula germinativa da maturação; C = em metáfase II; D = Não Identificado/degenerado. Objetiva 20x.

**Tabela 02:** Estágios de maturação oocitária após coloração com Hoescht 33342 dos grupos experimentais tratados com *Morinda citrifolia*.

TRAT	Total de oócitos	VG	RVG	MII	NI	Taxa maturação (%)
<b>Controle</b>	<b>202</b>	14 <sup>a</sup>	7 <sup>a</sup>	106 <sup>a</sup>	75 <sup>a</sup>	53 <sup>a</sup>
<b>A</b>	<b>205</b>	8 <sup>a</sup>	2 <sup>a</sup>	121 <sup>a</sup>	74 <sup>a</sup>	59 <sup>a</sup>
<b>B</b>	<b>201</b>	7 <sup>a</sup>	5 <sup>a</sup>	103 <sup>a</sup>	86 <sup>a</sup>	51 <sup>a</sup>
<b>C</b>	<b>209</b>	12 <sup>a</sup>	6 <sup>a</sup>	119 <sup>a</sup>	72 <sup>a</sup>	57 <sup>a</sup>

**Obs.:** Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística no teste do  $\chi^2$  ( $p < 0.05$ ) entre os tratamentos. Legenda: TRAT: tratamentos; VG: vesícula germinativa; RVG: rompimento da vesícula germinativa; MII: metáfase 2; NI: não identificado.

Segundo análise estatística deste estudo para avaliação da maturação nuclear dos CCOs (Tab. 02), observou-se que a suplementação dos meios de maturação com ou sem *M. citrifolia*, não provocou diferença significativa nas taxas de maturação nuclear. Estes dados indicam que *M. citrifolia*, como antioxidante, não provocou melhorias significativas na taxa de maturação dos oócitos. Porém, a literatura relata que a presença de antioxidante durante a maturação *in vitro* é essencial para maturação citoplasmática, resultando em melhores taxas de embriões (FURNUS *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2011).

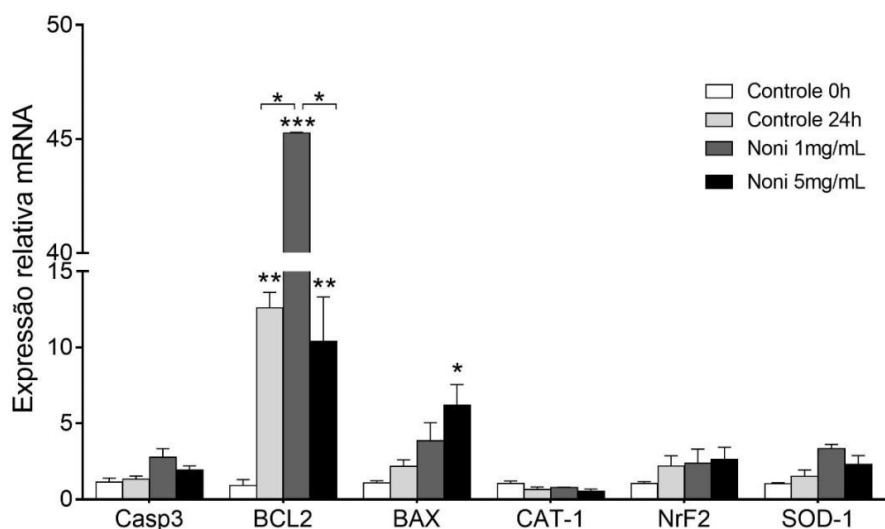
Estudos envolvendo a utilização de antioxidantes na maturação *in vitro* já foram realizados anteriormente obtendo bons resultados (GUEMRA *et al.*, 2013; GAD *et al.*, 2018). Assim como também existem estudos que demonstram a ação da quercetina como um potencial antioxidante. A quercetina é um dos principais metabólitos com ação antioxidante presentes na *M. citrifolia*. Em um experimento com PIV, a quercetina foi capaz de promover melhorias nas taxas de embriões quando utilizada durante a etapa da maturação *in vitro* (GUEMRA *et al.*, 2013). A quercetina sintética promoveu a inibição de radicais livres em um estudo relatado por

Braun *et al.* (2011). No estudo *in vivo* com camundongos, a quercetina foi capaz de reduzir danos celulares aos hepatócitos (LIU *et al.*, 2010).

Desta forma, esse estudo é pioneiro em utilizar o noni como antioxidante durante a MIV. Porém, tendo em vista que a *M. citrifolia* possui outros compostos químicos que podem atuar sinergicamente com a quercetina, existem também diversos metabólitos secundários que podem influenciar negativamente o processo da MIV. Portanto, uma análise da ação da quercetina extraída do suco do fruto de *M. citrifolia* na maturação *in vitro*, poderia trazer resultados complementares para esta pesquisa.

### PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

A análise da expressão do mRNA dos oócitos desta pesquisa revelou diferença estatística significativa entre os grupos experimentais para os genes Bcl-2 e BAX. Nas amostras do grupo tratado com *M. citrifolia* na concentração de 10mg/mL, não houve amplificação para os controles endógenos, não sendo possível avaliar a expressão gênica desse grupo. A Fig. 02 ilustra os resultados obtidos para mRNA por qRT-PCR.



**Figura 02:** Expressão relativa de mRNA analisada por qRT-PCR, para os genes Casp3, BCL2, BAX, CAT1, NrF2 e SOD1, e GAPDH como gene endógeno.

**Obs.:** Os dados representam média±desvio padrão. \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ; \*\*\* $p<0,001$  quando comparado com o controle 0h ou entre os colchetes, após análise de Kruskal-Wallis e teste de comparação múltipla de Dunn.

O grupo controle 24 horas e noni 5mg/mL apresentaram níveis elevados de mRNA para o gene BCL-2, sendo diferentes estatisticamente dos grupos controle 0h e noni 1mg/mL. O grupo noni 1mg/mL também apresentou regulação positiva da expressão de BCL-2, sendo distinto dos demais grupos e com os maiores níveis de mRNA para o gene BCL-2 entre os grupos avaliados. O gene BCL-2 foi utilizado na pesquisa no intuito de verificar os mecanismos anti-apoptóticos após os eventos da MIV.

Os genes pró-apoptóticos Casp3 e BAX apresentaram baixa quantificação de mRNA quando comparados ao gene anti-apoptótico BCL-2. Os dados mostram que as amostras das células de todos os grupos obtiveram expressões de mRNA em níveis basais, semelhante ao grupo controle, para o gene Casp3, assim como para os grupos Controle, A e B no gene BAX,

diferindo este apenas no grupo C (5mg/mL) onde a expressão deste gene se mostrou elevada em comparação com os demais tratamentos. Ambos os genes BAX e Casp3 são de característica pró-apoptótica, revelando que após a maturação *in vitro*, os oócitos ativam mecanismos contra a apoptose, uma vez que o aumento da produção das EROs durante a MIV, causa danos celulares aos oócitos e pode levar a morte celular (TRINDADE *et al.*, 2016). Portanto, esses resultados indicam que o tratamento com *M. citrifolia* desempenhou um papel importante de proteção dos oócitos contra a apoptose durante a MIV, evidenciado principalmente pela expressão de mRNA do grupo noni 1mg/mL.

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

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

## CONCLUSÕES

Os tratamentos utilizados neste trabalho com *M. citrifolia* não evidenciaram a ação antioxidante sobre a morfologia dos oócitos maturados *in vitro*. A expressão de mRNA do gene BCL-2 evidenciou que a *M. citrifolia* desempenhou função antiapoptótica sobre os aspectos moleculares dos oócitos maturados *in vitro*. Portanto, é necessário a realização de mais estudos envolvendo o uso de compostos isolados a partir do fruto do noni na maturação *in vitro* de oócitos, com a finalidade de elucidar quais destes compostos afetariam os resultados de maneira positiva ou negativa ou até trabalhando em sinergia, visto que o uso do fruto liofilizado não permitiu evidenciar quais e como os compostos agiram nas células estudadas.

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) sob recursos referentes ao edital nº 007/2017 – IECT BIOTECNOLOGIA.



## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-SOUZA, F.; DE SOUZA, C. DA S.F.; TANIWAKI, N.N.; SILVA, J.J.M.; DE OLIVEIRA, R.M.; ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S. *Morinda citrifolia* Linn. fruit (noni) juice induces an increase in no production and death of *Leishmania amazonensis* amastigotes in peritoneal macrophages from BALB/c. **Nitric Oxide**, v.58, p.51–58, 2016.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Molecular Immunology**, v.39, n.11, p.615-647, 2003.
- BORUSZEWSKA, D.; SINDEREWICZ, E.; KOWALCZYK-ZIEBA, I.; GRYCMACHER, K.; WOCLAWEK-POTOCKA, I. The effect of lysophosphatidic acid during *in vitro* maturation of bovine *cumulus–oocyte* complexes: *cumulus* expansion, glucose metabolism and expression of genes involved in the ovulatory cascade, oocyte and blastocyst competence. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.13, n.1, p.1-18, 2015.
- BRAUN, K.F.; EHNERT, S.; FREUDE, T.; EGAÑA, J.T.; SCHENCK, T.L.; BUCHHOLZ, A.; SCHMITT, A.; SIEBENLIST, S.; SCHYSCHKA, L.; NEUMAIER, M.; STÖCKLE, U.; NUSSLER, A.K. Quercetin protects primary human osteoblasts exposed to cigarette smoke through activation of the antioxidative enzymes HO-1 and SOD-1. **Scientific World Journal**, v.11, p.2348-2357, 2011.
- CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A.M.; REYNES, M.; BRILLOUET, J.M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, n.6/7, p.645-654, 2006.
- DAVIES, C.J.; ELDRIDGE, J.A.; FISHER, P.J.; SCHLAFER, D.H. Evidence for expression of both classical and non-classical major histocompatibility complex class I genes in bovine trophoblast cells. **American Journal of Reproductive Immunology**, v.55, n.3, p.188–200, 2006.
- DENG, S.; CHEN, C. S.; YANG, J. Chemistry of Medicinal Plants, Foods, and Natural Products 2015. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v.2015, n. especial, p.1-2, 2015.
- FONSECA, J.F. **Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e 317 caprinos**. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, n.16, Anais: Palestras. 2005.
- FURNUS, C.; DE MATOS, D.G.; PICCO, S.; PERAL GARCIA, P.; INDA, A.M.; MATTIOL, G.; ERRECALDE, A.L. Metabolic requirements associated with GSH synthesis during *in vitro* maturation of cattle oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.109, n.1/4, p.88-99, 2008.
- GAD, A.; ABU HAMED, S.; KHALIFA, M.; AMIN, A.; EL-SAYED, A.; SWIEFY, S.A.; EL-ASSAL, S. Retinoic acid improves maturation rate and upregulates the expression of antioxidant-related genes in *in vitro* matured buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes. **International Journal of Veterinary Science Medicine**, v.6, n.2, p.279-285, 2018.
- GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; P.R., ADONA. Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

GONÇALVES, P.B.D.; OLIVEIRA, M.A.L.; MEZZALIRA, A.; MONTAGNER, M.M.; VISINTIN, J.A.; COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2. ed. São Paulo, Editora Roca Ltda, 2014. p.261-291.

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

HEWITT, D.A.; ENGLAND, G.C.W. Incidence of oocyte nuclear maturation within the ovarian follicle of the bitch. **Veterinary Record**, v.143, n.21, p.590-591, 1998.

KUMAR, S. Caspase function in programmed cell death. **Cell Death Differentiation**, v.14, n.1, p.32-43, 2007.

LEIBFRIED-RUTLEDGE, M.L.; FIRST, N.L. Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. **Journal of Animal Science**, v.48, n.1, p.76-86, 1979.

LI, J.; NIU, D.; ZHANG, Y.; ZENG, X. Physicochemical properties, antioxidant and antiproliferative activities of polysaccharides from *Morinda citrifolia* L. (Noni) based on different extraction methods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.150, n.1040, p.114-121, 2020.

LIU, S.; HOU, W.; YAO, P.; ZHANG, B.; SUN, S.; NÜSSLER, A.K.; LIU, L. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, v.24, n.2, p.516-522, 2010.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.40, n.2, p.58-64, 2016.

SANTOS, S.S.D.; DANTAS, J.K.; MIRANDA, M.S.; BIONDI, F.C.; OHASHI, O.M. Cinética da maturação nuclear *in vitro* de oócitos bubalinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.5, p.266-270, 2002.

SAEED-ZIDANE M.; LINDEN L.; SALILEW-WONDIM D.; HELD E.; NEUHOFF C.; THOLEN E.; HOELKER M.; SCHELLANDER K.; TESFAYE D. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **PLOS ONE**, v.12, n.11, p.1-24, 2017.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE A.B.G.; LOPES C.A.P.; FIGUEIREDO J.R. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3, p.315-326, 2011.

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