



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO**  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ-UFPI**  
**PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO-PRPG**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA**  
**CAMPUS PROFESSORA CINOBELINA ELVAS-CPCE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA TROPICAL-PPGZT**

**MARCELA PEREIRA GUALTER**

**EFEITOS DA CROCINA E DA ANTOCIANINA NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS  
BOVINOS *IN VITRO***

Teresina-PI  
2025

**MARCELA PEREIRA GUALTER**

**EFEITOS DA CROCINA E DA ANTOCIANINA NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS  
BOVINOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia Tropical - PPGZT da Universidade Federal do Piauí - UFPI como requisito para obtenção do título de Mestre em Zootecnia Tropical na área de concentração Produção Animal nos Trópicos e linha de pesquisa: Melhoramento Genético e Reprodução Animal nos Trópicos

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Yndyra Nayan Teixeira Castelo Branco

Teresina-PI  
2025

FICHA CATALOGRÁFICA  
Universidade Federal do Piauí  
Biblioteca Setorial CCA  
Serviço de Representação Temática da Informação

G912e Gualter, Marcela Pereira.  
Efeitos da crocina e da antocianina na maturação de oócitos  
bovinos in vitro. / Marcela Pereira Gualter. -- 2025.  
37 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Centro  
de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia  
Tropical, 2025.

“Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa.”

1. Antioxidantes naturais. 2. Córpusculo polar. 3. Cúmulus. I.  
Costa, Amilton Paulo Raposo. II. Título.

CDD 636.08926


Bibliotecário: Rafael Gomes de Sousa - CRB3/1163

# EFEITOS DA CROCINA E DA ANTOCIANINA NA MATURAÇÃO DE OÓCITOS BOVINOS *IN VITRO*

MARCELA PEREIRA GUALTER

Dissertação aprovada em: 23/07/2025

Banca Examinadora:

Documento analisado digitalmente  
 AMILTON PAULO RAPOSO COSTA  
DATA: 23/07/2025 09:23:03-0300  
verifique em <https://validar.id.gov.br>


---

**Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa (Presidente) / DMV/CCA/UFPI**

Documento analisado digitalmente  
 ANTONIO DE SOUSA JUNIOR  
DATA: 24/07/2025 09:26:14-0300  
verifique em <https://validar.id.gov.br>


---

**Prof. Dr. Antônio de Sousa Junior (Interno) / CTT/UFPI**

Documento analisado digitalmente  
 FERNANDA PATRICIA GOTTARDI  
DATA: 24/07/2025 10:23:23-0300  
verifique em <https://validar.id.gov.br>

---

**Profa. Dra. Fernanda Patricia Gottardi (Interna) / CPCE/UFPI**

Documento analisado digitalmente  
 YNDYRA NAYAN TEIXEIRA CARVALHO CASTELO  
DATA: 24/07/2025 10:24:03-0300  
verifique em <https://validar.id.gov.br>

---

**Profa. Dra. Yndyra Nayan Teixeira Carvalho Castelo Branco (Interna) / DCCV/CCA/UFPI**

Documento analisado digitalmente  
 LUIZ ANTONIO SILVA FIGUEIREDO FILHO  
DATA: 23/07/2025 09:27:23-0300  
verifique em <https://validar.id.gov.br>

---

**Pesquisador Dr. Luiz Antônio Silva Figueiredo Filho (Externo) / IFMA**

Dedico aos meus avós e aos meus pais...

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Fernando Gualter e Márcia Pereira, pela dedicação, amor e esforço investidos na construção da minha trajetória. Por acreditarem no poder da educação e por nunca medirem esforços para que eu pudesse estudar e seguir em frente. Foram, e sempre serão, meu alicerce, minha base de apoio incondicional e minha maior inspiração. Com essa base familiar, pude chegar até aqui e poderei ir mais longe.

À minha irmã gêmea, Marjorie, com quem não compartilho apenas o DNA, mas também sonhos, desafios, conquistas e a própria vida. Obrigada por ser minha metade, meu espelho e meu porto seguro.

Aos meus amigos de infância, Dennyse e Rômulo, por permanecerem ao meu lado mesmo com o passar dos anos, cultivando amizade verdadeira e apoio mútuo.

Ao professor Luiz Augusto, que me acompanha desde a graduação, oferecendo suporte constante, orientação e incentivo. Sua presença foi fundamental na construção da minha carreira profissional. Pelo apoio científico e incentivo. Quem apresentou todas as oportunidades e abriu portas para que eu pudesse trabalhar.

À professora Dra. Tânia Cavalcante, exemplo de empatia, sabedoria e humanidade. Sua conduta ética e sensível é uma inspiração para todos que têm o privilégio de aprender com você.

Ao estimado professor Dr. Sousa Júnior, mestre generoso e dedicado, que me acolheu desde os primeiros passos no laboratório e compartilhou seu conhecimento com paciência e entusiasmo. Um exemplo de trabalho, empatia e acolhimento. O qual eu irei carregar uma “dívida” por todo apoio prestado, retribuindo com trabalho e cumplicidade. Conte sempre comigo.

Ao professor Dr. José Adalmir, por abrir as portas do Laboratório e permitir que eu trabalhasse e desenvolve toda a minha pesquisa. Sua presença foi significativa para a execução das atividades.

Ao meu orientador, professor Amilton Raposo, pela paciência, orientação e pela sabedoria compartilhada ao longo de toda essa jornada. Sua escuta atenta e conselhos foram fundamentais

À professora Dra. Yndyra Nayan Castelo Branco, minha coorientadora e mentora na Produção In Vitro de Embriões. Sou grata por cada ensinamento e pela confiança.

Ao professor Dr. Luiz Figueiredo, por aceitar o convite em participar da banca.

A professora Fernanda Gottardi, por aceitar o convite em participar da banca e por tantas informações sobre esse universo da produção in vitro de embriões.

Ao Colégio Técnico de Teresina (CTT), na pessoa do professor Jossivaldo de Carvalho Pacheco pela disponibilidade e apoio logístico, especialmente com o transporte cedido para as coletas de ovários, viabilizando parte essencial do projeto.

Ao médico veterinário, Sylvestre Melo, que junto ao abatedouro AGROCARNES e seus colaboradores, não mediu esforços para garantir a disponibilidade dos ovários que serviram de base para as pesquisas desenvolvidas.

Para as minhas queridas alunas do laboratório, “minhas meninas”, que através desse projeto formamos um grupo de amizade e apoio, compartilhando dores e alegrias. A prova do sinônimo de afeto e acolhimento entre nós mulheres nesse meio acadêmico e na vida: Ana Raquel, Maria Clara, Crisle Saykith, Hellen Aguiar.

Aos demais membros do laboratório, que com dedicação, comprometimento e entusiasmo contribuíram ativamente para o desenvolvimento deste projeto. Com essa equipe, construí e executei o meu projeto, graças ao esforço de cada um que se dedicou a me auxiliar: Kaio Falcão, Juliana Godinho, Carlos Eduardo “Calu”, Karl Marx, João Coimbra, Cauã Nobre, Amanda Maia. Cada um de vocês foi essencial.

À querida “dona” Noêmia, amiga sensível e atenciosa, com quem compartilhei conversas profundas e conselhos que levarei para a vida toda.

Ao Programa Centelha II Piauí e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, pelo fomento e apoio financeiro através de bolsa, fundamentais para a concretização deste trabalho.

Aos amigos da INEAGRO, especialmente Raquel, Elma, Geovane, pela rede de apoio, incentivo e amizade sincera durante essa caminhada.

Ao professor Felipe de Jesus, da Universidade Estadual do Maranhão que, ao lado de seus mestres e doutores, compartilhou valiosos ensinamentos sobre a técnica de coloração Hoechst 33342 em oócitos e embriões, enriquecendo ainda mais minha formação científica.

A cada pessoa mencionada e àquelas que, mesmo não citadas nominalmente, contribuíram de alguma forma para minha trajetória, deixo aqui registrado um profundo e eterno sentimento de: **GRATIDÃO.**

*“Um asteroide pequeno que todos chamam de Terra..”*

*Kryptônia-Zé Ramalho*

## RESUMO

GUALTER, Marcela Pereira. **Efeitos da crocina e da antocianina na maturação de oócitos bovinos *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Zootecnia Tropical)-Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2025.

A maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos representa uma etapa crítica para a eficiência da produção *in vitro* de embriões (PIVE), sendo altamente suscetível ao estresse oxidativo induzido pelas condições de cultivo. Nesse cenário, antioxidantes naturais têm sido propostos como aditivos promissores para mitigar danos celulares e preservar a competência oocitária. Este estudo avaliou os efeitos da suplementação com crocina (derivada de *Crocus sativus*) e antocianina (extrato seco de *Vaccinium macrocarpon*) sobre a MIV de oócitos bovinos. Oócitos grau I e II foram alocados em sete grupos experimentais: controle (sem antioxidantes), três grupos tratados com crocina (0,5, 1,0 e 10 µg/mL) e três com antocianina (0,2 1,0 e 10 µg/mL). Os cultivos foram realizados em meio MIV por 20 horas, com 25 oócitos por gota de 100 µL, em três repetições. Avaliaram-se a expansão do complexo cúmulo-oócito (CCO) e a extrusão do corpúsculo polar. Todos os grupos, inclusive os tratados com antioxidantes, apresentaram expansão satisfatória do CCO. Entretanto, a taxa de extrusão do CP foi significativamente reduzida nos grupos tratados com 10 µg/mL de crocina e antocianina, indicando comprometimento da maturação meiótica, possivelmente por interferência no equilíbrio redox intracelular. Os dados sugerem que, embora a crocina e a antocianina não afetem a morfologia do CCO, podem prejudicar a progressão meiótica em concentrações elevadas. Estes achados reforçam a necessidade de ajustes na dosagem de antioxidantes naturais utilizados na MIV, visando otimizar a qualidade oocitária sem comprometer o desenvolvimento nuclear.

**Palavras-chave:** Células do cúmulus. Corpúsculo polar. Antioxidantes naturais.

## ABSTRACT

GUALTER, Marcela Pereira .**Effects of crocin and anthocyanin on the maturation of bovine oocytes in vitro**. Dissertation (Master in Tropical Animal Science) - Federal University of Piauí, Teresina, 2025.

In vitro maturation (IVM) of bovine oocytes is a critical step for the efficiency of in vitro embryo production (IVEP), being highly susceptible to oxidative stress induced by culture conditions. In this context, natural antioxidants have been proposed as promising additives to mitigate cellular damage and preserve oocyte competence. This study evaluated the effects of crocin (derived from *Crocus sativus*) and anthocyanin (dry extract of *Vaccinium macrocarpon*) supplementation on bovine oocyte IVM. Grade I and II oocytes were allocated into seven experimental groups: control (no antioxidants), three treated with crocin (0.5, 1.0, and 10 µg/mL), and three with anthocyanin (0.2, 1.0, and 10 µg/mL). Oocytes were cultured in IVM medium for 20 hours, with 25 oocytes per 100 µL drop, in three replicates. The expansion of the cumulus-oocyte complex (COC) and extrusion of the first polar body (PB) were evaluated. All groups, including those treated with antioxidants, showed satisfactory COC expansion. However, PB extrusion rates were significantly reduced in groups treated with 10 µg/mL of crocin and anthocyanin, indicating impaired meiotic progression, possibly due to disruption of intracellular redox balance. The findings suggest that, although crocin and anthocyanin do not compromise COC morphology, they may impair nuclear maturation at higher concentrations. These results highlight the need to fine-tune antioxidant dosages in IVM protocols to optimize oocyte quality without compromising nuclear development.

**Keywords:** Cumulus cells. Polar corpuscle. Natural antioxidants

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Classificação de oócitos. ....	20
<b>Figura2-</b> Delineamento experimental .....	21
<b>Figura 3.</b> Morfologia dos complexos cúmulo-oócito (CCO's) após 20 horas de maturação <i>in vitro</i> sob ação da Antocionina .....	23
<b>Figura 4.</b> Morfologia dos complexos cúmulo-oócito (CCO's) após 20 horas de maturação <i>in vitro</i> sob ação da crocina .....	24
<b>Figura 5</b> – Avaliação da extrusão do corpúsculo polar em oócitos bovinos desnudos após maturação <i>in vitro</i> com antocianina.....	27
<b>Figura 6</b> – Avaliação da extrusão do corpúsculo polar em oócitos bovinos desnudos após maturação <i>in vitro</i> com crocina .....	27

## LISTA DE TABELA

**Tabela 1**-As substancias foram aliquotadas em microtubos e estocadas a 20°C .....22

**Tabela 2.** Efeito de diferentes tratamentos antioxidantes sobre a expansão das células do cúmulus em oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* (médias dos mínimos quadrados). ..... 25

**Tabela 3.** Efeito de diferentes tratamentos antioxidantes sobre a taxa de extrusão do corpúsculo polar em oócitos bovinos submetidos à MIV (médias dos mínimos quadrados). ..... 26

## LISTA DE SIGLAS

<b>AMPc</b>	Monofosfato de adenosina cíclico
<b>CCO's</b>	Complexo Cúmulos oócitos
<b>CP</b>	Corpúsculo Polar
<b>ERO's</b>	Espécies Reativas de Oxigênio
<b>FSH</b>	Hormônio Folículo-Estimulante
<b>LH</b>	Hormônio Luteinizante
<b>MIV</b>	Maturação in vitro
<b>VG</b>	Vesícula Germinativa
<b>RNAs</b>	Ácido Ribonucleico

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETIVOS .....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REFERENCIAL TEÓRICO .....	13
3.1 Biologia e maturação dos oócitos bovinos.....	13
3.2 Maturação in vitro de oócitos (MIV).....	14
3.3 Uso de antioxidantes naturais na reprodução in vitro .....	16
3.4 Crocina: origem, propriedades e aplicações biotecnológicas.....	17
3.5 Antocianinas: origem, propriedades e aplicações na reprodução in vitro .....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Parecer do comitê de ética .....	18
4.2 Obtenção de Ovários.....	18
4.3 Local do experimento.....	19
4.4 Obtenção e aspiração dos complexos cumulus-oócitos .....	19
4.5 Experimento – (MIV).....	20
4.6 Diluição e estoques das substâncias antioxidantes .....	20
4.7 Maturação in vitro (MIV).....	21
4.8 Avaliação da maturação oocitária .....	22
4.9 Avaliação da expansão do complexo cúmulo-oócito .....	22
4.10 Avaliação da extrusão do corpúsculo polar.....	22
5 RESULTADOS .....	22
5.1 Expansão do complexo cúmulo-oócito .....	22
5.2 Extrusão do corpúsculo polar.....	25
6 DISCUSSÃO .....	27

7 CONCLUSÃO .....	29
8 REFERÊNCIAS .....	30

## 1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, os avanços na biotecnologia da reprodução animal têm ampliado as possibilidades de manipulação *in vitro* de gametas e embriões, contribuindo significativamente para o melhoramento genético e a produtividade de rebanhos bovinos. A técnica de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos representa uma etapa crítica nesse processo, uma vez que a qualidade do oócito influencia diretamente o sucesso da fertilização e do desenvolvimento embrionário subsequente (BURATINI et al., 2023)

Durante a MIV, no entanto, os oócitos são expostos a condições extracelulares artificiais que favorecem o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), resultando em estresse oxidativo. Esse desequilíbrio redox pode comprometer a integridade das membranas celulares, o fuso meiótico, a função mitocondrial e o DNA, culminando em prejuízos à competência oocitária e às taxas de clivagem e formação de blastocistos (WANG et al., 2021).

Nesse contexto, o uso de antioxidantes no meio de maturação tem se consolidado como uma estratégia para mitigar os danos oxidativos e preservar a viabilidade celular. Mas recentemente, o foco de pesquisas têm se voltado para antioxidantes de origem natural, devido à sua biocompatibilidade, menor toxicidade e potencial bioativo. Dentre esses, destacam-se a crocina, um carotenoide presente no açafrão (*Crocus sativus* L.), e as antocianinas, flavonoides abundantes em frutas vermelhas como o cranberry (*Vaccinium macrocarpon*), ambas com reconhecida ação antioxidante, antiapoptótica e anti-inflamatória (Mokhber Maleki et al., 2016).

Apesar dos avanços, ainda existem lacunas relevantes na literatura científica no que se refere à aplicação dessas moléculas na reprodução *in vitro* de bovinos. A maioria dos estudos concentra-se em modelos murinos ou utiliza formulações pouco padronizadas dos compostos, o que dificulta a extrapolação dos resultados. Além disso, são escassas as investigações comparativas entre crocina e antocianinas no mesmo modelo experimental, especialmente utilizando critérios simultâneos como expansão do complexo cúmulo-oócito e extrusão do corpúsculo polar. Tais lacunas limitam o conhecimento acerca dos mecanismos de ação dessas substâncias e suas reais contribuições à competência oocitária.

Diante disso, a presente pesquisa se propõe a investigar os efeitos da crocina e das antocianinas durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos, com o objetivo de elucidar suas potenciais contribuições na proteção contra o estresse oxidativo e na promoção da competência nuclear dos gametas. Ao abordar um tema ainda pouco explorado em bovinos, com metodologia padronizada e critérios

de avaliação múltiplos, o estudo busca avançar no entendimento da utilização racional e eficaz de antioxidantes naturais em sistemas de produção in vitro.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar os efeitos da suplementação com crocina e antocianina no meio de maturação in vitro (MIV) de oócitos bovinos, com base na expansão do complexo cúmulo-oócito, na extrusão do corpúsculo polar

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar o grau de expansão das células do cúmulo ooforo em oócitos submetidos à MIV com diferentes concentrações de crocina e antocianina.
- Avaliar a taxa de extrusão do corpúsculo polar, como indicador de maturação nuclear, em oócitos tratados com os antioxidantes naturais.
- Comparar os efeitos entre as diferentes concentrações de crocina e antocianina utilizadas, verificando a possível existência de dose-resposta e o desempenho relativo entre os dois antioxidantes.
- Contribuir para o conhecimento sobre o uso de antioxidantes naturais na biotecnologia da reprodução bovina, visando ao aprimoramento das técnicas de produção in vitro de embriões.

## **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **3.1 Biologia e maturação dos oócitos mamíferos**

O oócito é a célula germinativa feminina responsável por armazenar o material genético e os componentes citoplasmáticos necessários para o início do desenvolvimento embrionário após a fecundação. Nos mamíferos, incluindo os bovinos, os oócitos permanecem bloqueados na fase de prófase I da meiose desde antes do nascimento, sendo ativados para retomar a divisão meiótica durante o desenvolvimento folicular (Buratini et al., 2023;Gottardi; Mingoti, 2009)

Durante o crescimento folicular, os oócitos mantêm íntima interação com as células do cúmulo, formando o chamado complexo cúmulo-oócito (CCO). Essa interação é essencial para a aquisição da competência oocitária, isto é, a capacidade do oócito de retomar e completar a meiose, ser fertilizado e originar um embrião viável

(Appeltant et al., 2015). As células do cúmulo fornecem substratos energéticos, íons, fatores de crescimento e sinalização, fundamentais para a maturação nuclear e citoplasmática do oócito.

A maturação nuclear corresponde à retomada da meiose e envolve a progressão da vesícula germinativa (VG) até a metáfase II (MII), estágio no qual o oócito é considerado pronto para a fertilização. Essa progressão inclui eventos como a ruptura da membrana, saída da vesícula germinativa (GVBD), a condensação cromossômica e a extrusão do primeiro corpúsculo polar (Brown et al., 2017; Sirard, 2012). Paralelamente, ocorre a maturação citoplasmática, que compreende a reorganização do citoesqueleto, redistribuição de organelas (como mitocôndrias e retículo endoplasmático), acúmulo de RNAs mensageiros e proteínas essenciais à fertilização e ao desenvolvimento embrionário inicial (Reader; Stanton; Juengel, 2017)

A adequada coordenação entre os processos de maturação nuclear e citoplasmática é essencial para a competência do oócito. Alterações ambientais, metabólicas ou oxidativas durante o desenvolvimento folicular ou a manipulação *in vitro* podem comprometer essa competência, resultando em oócitos que atingem a MII morfologicamente, mas que são biologicamente ineficazes (Rizos et al., 2008; Britt, 2008).

### **3.2 Maturação *in vitro* de oócitos (MIV)**

A maturação *in vitro* (MIV) é uma das etapas mais críticas da biotecnologia da reprodução assistida em bovinos. Essa técnica consiste na retomada e progressão da meiose dos oócitos imaturos, provenientes de folículos ovarianos antrais, em ambiente controlado e livre de estímulos endócrinos naturais. A MIV tem como objetivo alcançar o estágio de metáfase II (MII), no qual os oócitos apresentam competência para serem fertilizados e iniciarem o desenvolvimento embrionário (Rizos et al., 2008)

O sucesso da MIV está diretamente relacionado à qualidade inicial do oócito e à composição do meio de cultivo. Os meios comerciais mais utilizados, como o TCM-199, são geralmente suplementados com hormônios (FSH, LH e estradiol), soro fetal bovino (SFB), piruvato, aminoácidos e antibióticos, com o intuito de mimetizar o ambiente folicular (Mori; Amano; Shimizu, 2000). Durante o cultivo, que normalmente dura de 20 a 24 horas, os oócitos são mantidos em estufas de atmosfera controlada (5% CO<sub>2</sub> a 38,5 °C), em gotas de meio sob óleo mineral.

A avaliação da maturação oocitária pode ser feita por diferentes métodos, sendo os mais comuns a expansão das células do cúmulo e a extrusão do corpúsculo polar. O grau de expansão do complexo cúmulo-oócito (CCO) é um indicativo de

resposta às condições do meio e à presença de gonadotrofinas, enquanto a presença do corpúsculo polar confirma a progressão meiótica até a MII. (Loneragan; Fair, 2014)

No entanto, a maturação *in vitro* frequentemente apresenta taxas inferiores de sucesso quando comparada à maturação *in vivo*, em razão da ausência de fatores endócrinos, parácrinos e do microambiente fisiológico. Além disso, o cultivo em condições artificiais favorece o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem comprometer tanto a maturação nuclear quanto a citoplasmática, prejudicando a competência do oócito e o desenvolvimento embrionário subsequente (Khazaei; Aghaz, 2017).

Durante a maturação *in vitro* de oócitos (MIV), uma das principais limitações enfrentadas é a exposição das células a níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs), que podem comprometer a qualidade oocitária e, conseqüentemente, o sucesso das etapas subseqüentes do desenvolvimento embrionário. As EROs são moléculas altamente instáveis, formadas principalmente a partir da redução incompleta do oxigênio molecular, e incluem radicais livres como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $OH\cdot$ ) (Guérin; El Mouatassim; Ménézo, 2001)

Embora os EROs exerçam funções fisiológicas importantes em concentrações controladas, como regulação da transdução de sinais celulares e modulação da ovulação e da fertilização, seu excesso pode causar desequilíbrio redox, levando ao estresse oxidativo. Esse fenômeno é caracterizado por danos a estruturas celulares sensíveis, incluindo membranas lipídicas, proteínas, mitocôndrias e DNA, afetando negativamente a viabilidade e a competência dos oócitos (Agarwal; Gupta; Sharma, 2005).

Nas condições *in vitro*, a geração de EROs tende a ser exacerbada em virtude da ausência de mecanismos naturais de defesa antioxidante presentes no microambiente folicular *in vivo*, como enzimas (superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase) e compostos antioxidantes não enzimáticos (vitaminas E e C, glutathione, entre outros). Além disso, fatores como a alta tensão de oxigênio atmosférico, manipulação mecânica, exposição à luz e composição dos meios de cultivo podem contribuir significativamente para o acúmulo de espécies oxidantes durante a MIV (Agarwal; Saleh; Bedaiwy, 2003)

Diversos estudos têm demonstrado que o estresse oxidativo está associado a alterações na maturação nuclear, comprometimento da expansão do complexo cúmulo-oócito, fragmentação do DNA, disfunção mitocondrial e aumento de apoptose, o que reduz a taxa de fecundação e o potencial de desenvolvimento embrionário

(Somfai et al., 2007). Dessa forma, o controle da homeostase redox durante a MIV tem sido considerado um fator chave para a melhoria da competência oocitária.

Neste contexto, o uso de substâncias com ação antioxidante vem sendo amplamente investigado como uma estratégia promissora para proteger os oócitos dos efeitos deletérios do estresse oxidativo. A adição de compostos antioxidantes aos meios de maturação visa restabelecer o equilíbrio redox celular, preservando a integridade das estruturas celulares e favorecendo o desenvolvimento embrionário pós-fertilização.

### **3.3 Uso de antioxidantes naturais na reprodução *in vitro***

A crescente compreensão dos impactos negativos do estresse oxidativo sobre a qualidade dos oócitos e o desenvolvimento embrionário tem estimulado a busca por estratégias que promovam a homeostase redox durante a maturação *in vitro* (MIV). Dentre essas estratégias, destaca-se a utilização de antioxidantes naturais, compostos bioativos capazes de neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs), protegendo as estruturas celulares contra danos oxidativos (Guemra et al., 2013).

Antioxidantes naturais são encontrados em uma ampla variedade de fontes vegetais, como frutas, raízes, flores e especiarias, e incluem moléculas como polifenóis, flavonoides, carotenoides e antocianinas. Estas substâncias apresentam elevado potencial redutor, agindo por diferentes mecanismos, como a doação de elétrons, quelação de metais e modulação da expressão gênica de enzimas antioxidantes endógenas (Tripathi et al., 2023). A aplicação dessas moléculas na reprodução assistida representa uma alternativa promissora frente a antioxidantes sintéticos, devido à sua biocompatibilidade e baixa toxicidade.

No contexto da biotecnologia da reprodução bovina, estudos têm avaliado o efeito da suplementação do meio de maturação com antioxidantes naturais, demonstrando resultados positivos sobre a morfologia dos complexos cúmulo-oócito, a taxa de extrusão do corpúsculo polar e o desempenho pós-fertilização (De Oliveira Santos et al., 2018). Compostos como o resveratrol, o ácido ascórbico, a quercetina e os extratos de frutas ricas em antocianinas, como o mirtilo e o cranberry, têm sido utilizados com sucesso na atenuação dos efeitos deletérios das EROs.

Além disso, antioxidantes naturais podem influenciar positivamente a função mitocondrial, a integridade do DNA e o perfil de expressão gênica relacionado à apoptose e ao metabolismo energético dos oócitos (Rakha et al., 2022). Estes efeitos contribuem para a melhora da qualidade oocitária, aumento da taxa de clivagem e elevação da proporção de blastocistos viáveis em protocolos de fertilização *in vitro* (FIV).

### **3.4 Crocina: origem, propriedades e aplicações biotecnológicas**

A crocina é um carotenoide glicosilado hidrossolúvel, extraído principalmente dos estigmas secos da flor *Crocus sativus* L., conhecida como açafrão verdadeiro. Trata-se de um dos principais constituintes bioativos do açafrão, responsável por sua coloração alaranjada e por diversas propriedades farmacológicas e biológicas atribuídas à planta (Farkhondeh et al., 2018).

Do ponto de vista químico, a crocina pertence à classe dos apocarotenoides e possui elevada capacidade antioxidante, devido à sua estrutura rica em ligações duplas conjugadas, que atuam na neutralização de radicais livres e na prevenção da peroxidação lipídica (Pourmousavi et al., 2024). Diferente da maioria dos carotenoides, que são lipossolúveis, a crocina é solúvel em água, o que favorece sua utilização em sistemas biológicos aquosos, como os meios de cultivo celular e embrionário.

Diversos estudos têm demonstrado que a crocina apresenta efeitos benéficos em diferentes sistemas biológicos, incluindo atividade anti-inflamatória, neuroprotetora, anticancerígena e hepatoprotetora (Pourmousavi et al., 2024). Além disso, sua ação antioxidante tem sido particularmente estudada em modelos celulares e animais submetidos a estresse oxidativo, o que a torna uma candidata promissora para aplicações na biotecnologia da reprodução.

Na reprodução assistida, a crocina tem sido explorada como suplemento em meios de cultivo de gametas e embriões, com o objetivo de minimizar os danos provocados pelas espécies reativas de oxigênio (EROs) durante a maturação *in vitro* (MIV) e o cultivo embrionário. Em modelos murinos e bovinos, a crocina demonstrou melhorar a morfologia dos complexos cúmulo-oócito, aumentar a taxa de extrusão do corpúsculo polar, preservar a integridade mitocondrial e reduzir os índices de apoptose celular (Maleki et al., 2016; Peetinarak et al., 2023)

### **3.5 Antocianinas: origem, propriedades e aplicações na reprodução *in vitro***

As antocianinas são pigmentos naturais pertencentes ao grupo dos flavonoides, amplamente distribuídos em vegetais, especialmente em frutas de coloração vermelha, roxa e azul, como uva, amora, mirtilo, jabuticaba e cranberry (*Vaccinium macrocarpon*). Quimicamente, trata-se de glicosídeos de antocianidinas, como cianidina, delphinidina e pelargonidina, responsáveis pela intensa coloração e pelas propriedades bioativas dessas moléculas (He; Giusti, 2010)

Além de seu valor estético e funcional na alimentação, as antocianinas têm despertado interesse crescente na área biomédica devido ao seu elevado potencial antioxidante, anti-inflamatório, imunomodulador e citoprotetor. Sua capacidade de

neutralizar espécies reativas de oxigênio (EROs) e de modular enzimas antioxidantes endógenas, como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutathione peroxidase (GPx), posiciona esses compostos como candidatos promissores para diversas aplicações biotecnológicas (Kong et al., 2003; Wang; Stoner, 2008)

Na reprodução *in vitro*, o uso de antocianinas tem sido estudado como estratégia para atenuar o estresse oxidativo durante a maturação oocitária, protegendo as células contra os efeitos deletérios causados pelo acúmulo de radicais livres. Estudos recentes demonstraram que a suplementação do meio de maturação com extratos ricos em antocianinas pode melhorar a expansão do complexo cúmulo-oócito, preservar a integridade do fuso meiótico, aumentar a taxa de extrusão do corpúsculo polar e favorecer a expressão de genes associados à competência oocitária (You et al., 2010; Zegarra et al., 2021)

Em modelos bovinos e murinos, as antocianinas também se mostraram eficazes na redução da apoptose e no aumento da viabilidade celular após a MIV, o que se reflete em maior eficiência nos protocolos de fertilização *in vitro* (FIV) e desenvolvimento embrionário subsequente. A atuação antioxidante dessas moléculas ocorre tanto pela inativação direta das EROs quanto pela modulação de vias celulares que regulam a resposta ao estresse, como a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a via da proteína nuclear Nrf2 (Liu et al., 2021).

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Parecer do comitê de ética**

Este trabalho foi submetido a avaliação e apreciação na Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Piauí (CEUA/UFPI) aprovado em 12 de Abril de 2021, sob o nº de protocolo 670/21.

### **4.2 Obtenção de Ovários**

Os ovários foram obtidos de fêmeas bovinas abatidas em matadouro sob inspeção municipal, localizado no Município de Teresina-PI. Após a coleta, estes eram transportados até o laboratório em um recipiente térmico com solução fisiológica 0,9% a uma temperatura de 37°C. O tempo total entre deslocamento ao laboratório de biotecnologia da reprodução, coleta e retorno, foi em média de 3 horas.

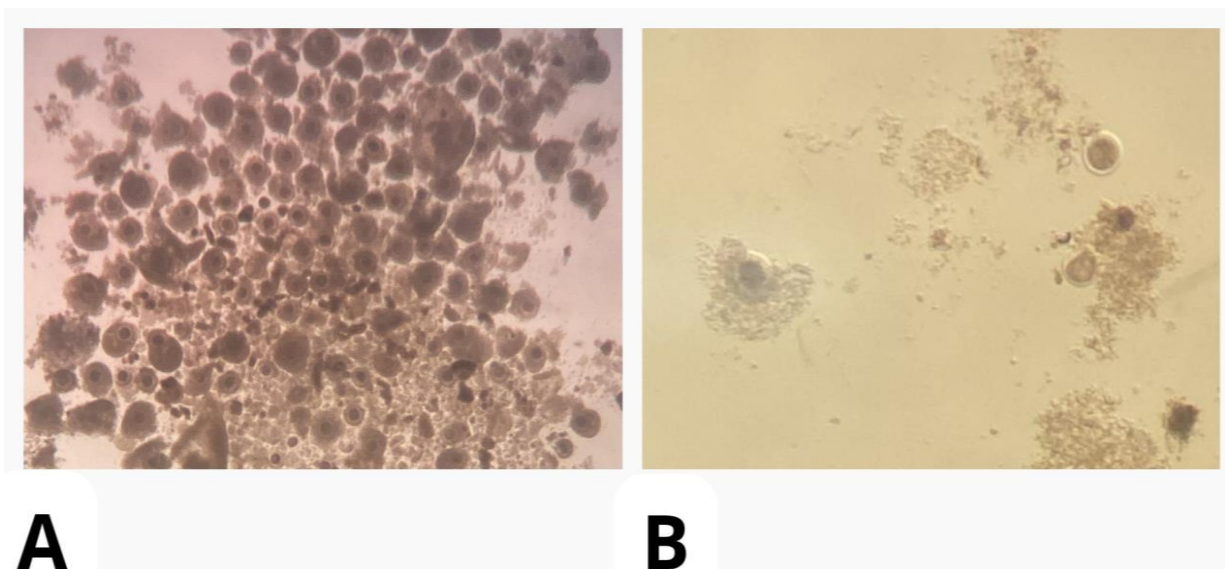
### 4.3 Local do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (LBRA) do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina – PI, Brasil.

### 4.4 Obtenção e aspiração dos complexos cumulus-oócitos

No laboratório, os ovários foram lavados com solução fisiológica, desinfetados com álcool etílico hidratado 70% e enxaguados três vezes em solução fisiológica (NaCl 0,9%) a 37°C sendo os complexos cumulus oócitos (CCOs) recuperados por aspiração dos folículos antrais, utilizando agulhas descartáveis 25 x 8 mm (21G), acopladas a uma seringa de 3mL. O líquido folicular obtido foi colocado em um tubo do tipo Falcon de 15mL e armazenado em banho-maria a 37°C, durante 10 minutos para sedimentação. O conteúdo do aspirado folicular foi depositado em uma placa de Petri de 90 x 15 mm mantida em uma platina aquecedora, para rastreamento dos CCOs sob uma lupa estereomicroscópica Nikon SMZ 645. Os CCOs selecionados foram transferidos para uma placa de Petri 60 x 15 mm contendo meio de manutenção Holding (Reprodux<sup>®</sup>), e classificados de acordo com a qualidade morfológica em Graus I, II, III e IV (Leidfried; First, 1979). Somente os CCOs viáveis (Grau I e II) foram selecionados para maturação de acordo com os tratamentos, conforme a figura 1.

**Figura 1** Classificação de oócitos.

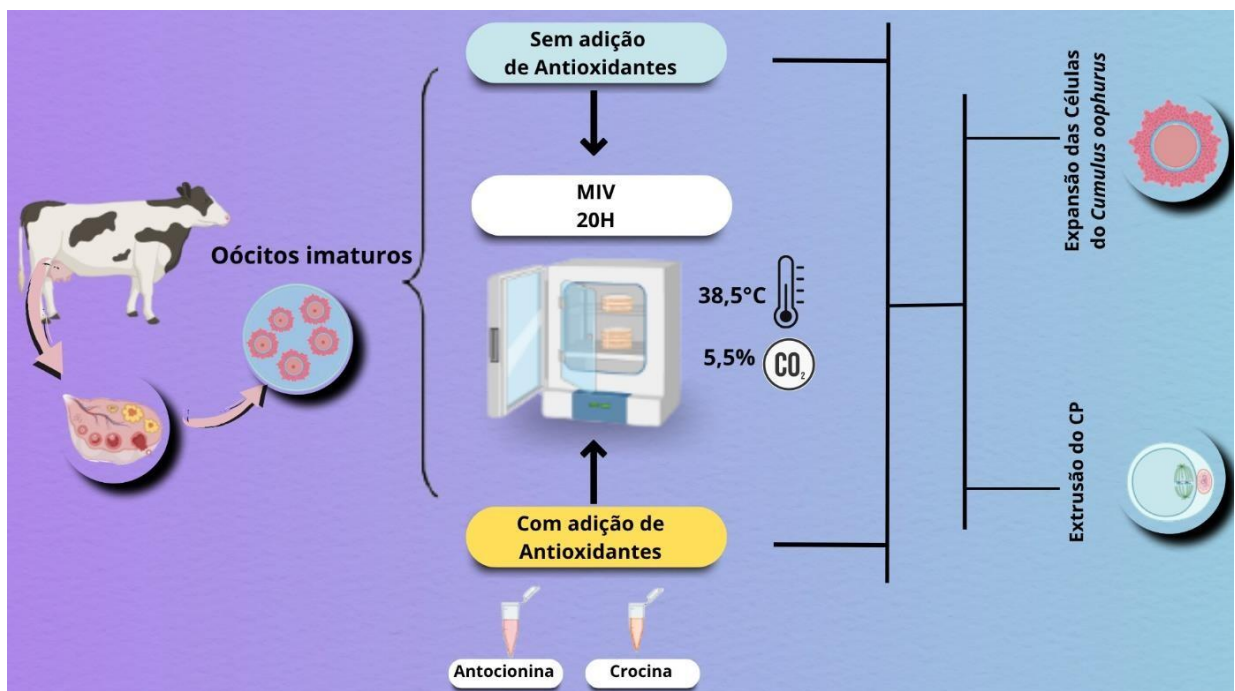


Observação à lupa de complexos cumulus oócito de *Bos taurus*, com massa completa e compacta de cumulus oócito e ooplasma homogêneo, classificação Grau I e Grau II (A) e cumulus oócitos parcialmente expandidos e desnudo, classificação Grau III e IV (B) 40x. Fonte: Elaboração da autora (2025).

#### 4.5 Delineamento Experimental – (MIV)

Para avaliar os efeitos da Crocina e Antocionina na maturação *in vitro* de oócitos, foram utilizados 350 oócitos, cultivados na ausência ou presença desses antioxidantes. Os complexos cúmulus oócito (CCOs) foram submetidos à maturação *in vitro* (MIV) em diferentes concentrações de antioxidantes naturais, organizados em sete grupos experimentais: um grupo controle (C) com meio MIV Bioklone®, três grupos tratados com antocianina (AI – 0,2 µg/mL, AII – 1,0 µg/mL, AIII – 10 µg/mL) e três grupos com crocina (CI – 0,5 µg/mL, CII – 1,0 µg/mL, CIII – 10 µg/mL). Cada grupo foi avaliado em duas repetições experimentais, com 25 CCOs por gota.

**Figura 2.** Delineamento experimental.



Esquema representativo do delineamento experimental para avaliar a maturação de oócitos *in vitro*. Os grupos formados a partir da MIV foram separados de acordo com a adição dos extratos de Antocionina (Grupo AI 0,2µg/ml; AII 1,0µg/ml; AIII 10µg/ml) Crocina (Grupo CRI 0,5µg/ml; CRII 1,0 µg/ml; CRIII 10µg/ml) e grupo controle sem a adição de antioxidantes. Fonte: Elaboração da autora (2025)

#### 4.6 Diluição e estoques das substâncias antioxidantes

Para a suplementação do meio de maturação *in vitro* (MIV), utilizaram-se antocianina e crocina em formulações comerciais (Equilíbrio®) na forma de pó, sendo estas previamente pesadas (10 mg) e diluídas em 100 mL de solução fisiológica, sob

condições assépticas. Essa preparação originou soluções estoque com concentração final de  $10 \text{ mg/mL}^{-1}$  ( $10.000 \text{ } \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

Essa solução estoque do extrato, no momento de ser adicionada ao meio de maturação, foi diluída em solução fisiológica até alcançar as concentrações dos grupos tratados (Controle: sem adição de antioxidante) antocionina (AI  $0,2\mu\text{g}$ ; All  $1,0\mu\text{g}$ ; e All  $10 \mu\text{g}$ ) e crocina (CRI  $0,5\mu\text{g}$ ; CRII  $1,0\mu\text{g}$ ; e CRIII  $10 \mu\text{g}$ ), conforme a Tabela 1.

**Tabela 1: As substâncias foram aliqüotadas em microtubos e estocadas a  $-20^\circ\text{C}$ .**

Antioxidantes	Concentração	Diluentes	Nome Comercial	Volume de Meio MIV
Antocionina	$10 \text{ mg/mL}$	NaCl $0,9\%$	Manipulado	
Antocianina	$0,2 \mu\text{g/mL}$	MIV	Bioklone <sup>®</sup>	$99,8 \mu\text{L}$
Antocionina	$1,0 \mu\text{g/mL}$	MIV	Bioklone <sup>®</sup>	$99 \mu\text{L}$
Antocionina	$10 \mu\text{g/mL}$	MIV	Bioklone <sup>®</sup>	$90 \mu\text{L}$
Crocina	$10 \text{ mg/mL}$	NaCl $0,9\%$	Manipulado	
Crocina	$10 \text{ mg/mL}$	NaCl $0,9\%$	Manipulado	
Crocina	$0,5 \mu\text{g/mL}$	MIV	Bioklone <sup>®</sup>	$99,5 \mu\text{L}$
Crocina	$1,0 \mu\text{g/mL}$	MIV	Bioklone <sup>®</sup>	$99 \mu\text{L}$
Crocina	$10 \mu\text{g/mL}$	MIV	Bioklone <sup>®</sup>	$90 \mu\text{L}$

#### 4.7 Maturação in vitro (MIV)

Os CCOs selecionados, foram lavados três vezes em meio de maturação (Bioklone<sup>®</sup>), em placas de petri  $90 \times 15 \text{ mm}$ , sendo que para cada uma das lavagens foi utilizado  $50 \mu\text{L}$  de meio, e maturados de acordo com os tratamentos: antocionina (AI  $0,2\mu\text{g}$ ; All  $1,0\mu\text{g}$ ; e All  $10 \mu\text{g}$ ) e crocina (CRI  $0,5\mu\text{g}$ ; CRII  $1,0\mu\text{g}$ ; e CRIII  $10 \mu\text{g}$ ), e na ausência dos antioxidantes (controle) em microgotas contendo  $100 \mu\text{L}$  de meio de maturação (Bioklone<sup>®</sup>), em uma placa de petri  $35 \times 10 \text{ mm}$  sob óleo mineral (BotuFIV<sup>®</sup> Oil) em incubadora com atmosfera de  $5,5\%$  de  $\text{CO}_2$  a  $38,5^\circ\text{C}$  por um período de 20 horas. Cada gota continha aproximadamente 25 oócitos.

#### **4.8 Avaliação da maturação oocitária**

A avaliação da maturação dos oócitos foi realizada por meio de duas abordagens complementares: a análise morfológica da expansão das células do cúmulo e a verificação da extrusão do corpúsculo polar após desnudamento.

#### **4.9 Avaliação da expansão do complexo cúmulo-oócito**

Ao término das 20 horas de cultivo no meio de maturação in vitro (MIV), os oócitos foram avaliados quanto ao grau de expansão das células do cúmulo sob estereomicroscópio( Nikon® SMZ 645). O grau de expansão foi classificado em três categorias:

- Sem expansão: células do cúmulo compactas, firmemente aderidas ao oócito;
- Expansão parcial: expansão evidente, porém com algumas camadas ainda compactas;
- Expansão total: dispersão completa das células do cúmulo, indicando resposta adequada ao estímulo de maturação.

#### **4.10 Avaliação da extrusão do corpúsculo polar**

Após a avaliação da expansão, os oócitos foram submetidos ao processo de desnudamento mecânico e químico (DENU D BLOKONE ®), por pipetagem repetida em meio tamponado, com o objetivo de remover as células do cúmulo e expor a zona pelúcida.

Os oócitos desnudados foram então analisados sob microscópio invertido Nikon Eclipse Ti, as imagens foram capturadas pela câmera HiROCAM® (aumento de 200x a 400x), sendo classificados quanto à presença ou ausência do corpúsculo polar. A extrusão do corpúsculo polar é considerada um indicador confiável de maturação nuclear até a metáfase II (MII), estágio ideal para fertilização.

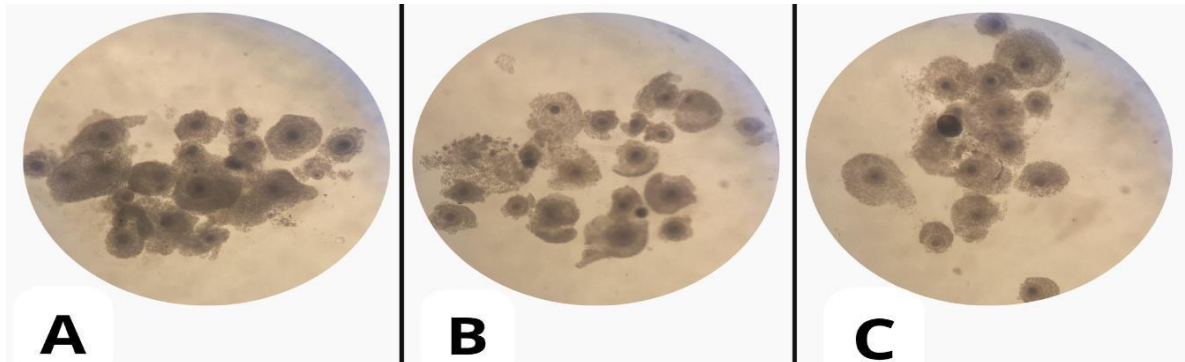
## **5 RESULTADOS**

### **5.1 Expansão do complexo cúmulo-oócito**

Em todos os grupos experimentais, incluindo o controle e os grupos tratados com antocianina e crocina, foi observada expansão do complexo do cúmulo ao final do período de maturação (20 horas). A expansão foi visível macroscopicamente pela

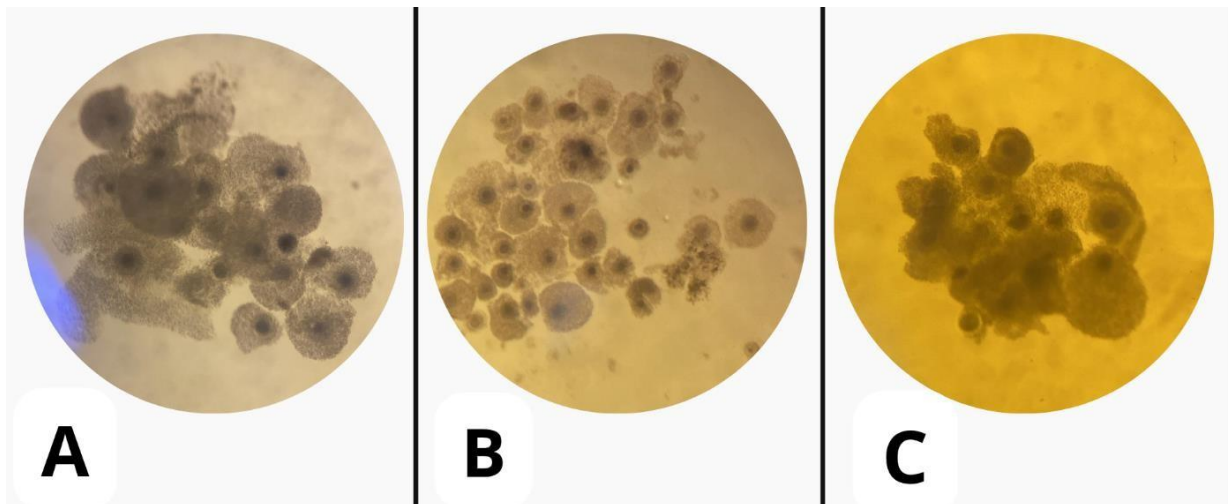
dispersão das células do cúmulo ao redor do oócito e pela perda da compactação típica dos CCOs imaturos. Não foram observadas diferenças visuais marcantes entre os grupos com relação ao grau de expansão, conforme as figuras 1 e 2.

**Figura 3.** Morfologia dos complexos cúmulo oócito (CCOs) após 20 horas de maturação *in vitro* sob ação da Antocionina



Observa-se boa expansão das células do cúmulo, com estrutura compacta. (A) Grupo AI 0,2µg/mL;(B) Grupo AII 1,0 µg/mL. (C) Grupo AIII 10µg/mL. Fonte: Elaboração da autora (2025).

**Figura 4.** Morfologia dos complexos cúmulo-oócito (CCOs) após 20 horas de maturação *in vitro* sob ação da crocina



Observa-se expansão moderada e mais uniforme do cúmulo, com evidência de descompactação periférica (A) Grupo CRI 0,5µg/ml; (B) CRII 1,0 µg/ml; (C) CRIII 10µg/ml. Fonte: Elaboração da autora (2025).

A análise estatística da expansão das células do cúmulo em oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* (MIV) revelou que não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais ( $P = 0,061$ ). As médias dos mínimos quadrados demonstraram que os grupos controle (C), AI (antocianina 0,2 µg/mL) e CRI (crocina 0,5 µg/mL) apresentaram as maiores médias de expansão ( $25,000 \pm 0,199$ ). Já os grupos submetidos às concentrações mais elevadas dos antioxidantes, como AIII (antocianina 10 µg/mL) e CRIII (crocina 10 µg/mL),

apresentaram médias ligeiramente inferiores ( $24,333 \pm 0,199$ ), conforme a tabela 1.

Esses dados indicam que a adição de antocianina ou crocina, nas concentrações testadas, não comprometeu de forma significativa a expansão do complexo cúmulo-oócito, sendo mantidos níveis semelhantes ao controle mesmo nos grupos tratados. No entanto, as menores médias observadas nos grupos com maiores concentrações sugerem um possível efeito dose-dependente moderado, o que pode refletir alguma interferência metabólica sutil dos antioxidantes na arquitetura celular do cúmulus, ainda que sem repercussão estatística detectável neste delineamento experimental.

**Tabela 2.** Efeito de diferentes tratamentos antioxidantes sobre a expansão das células do cúmulus em oócitos bovinos submetidos à maturação *in vitro* (médias dos mínimos quadrados).

Grupo	Tratamento	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média $\pm$ EP
C	Controle	—	$25,000 \pm 0,199$
AI	Antocianina	0,2	$25,000 \pm 0,199$
AII	Antocianina	1,0	$24,333 \pm 0,199$
AIII	Antocianina	10,0	$24,333 \pm 0,199$
CRI	Crocina	0,5	$25,000 \pm 0,199$
CRII	Crocina	1,0	$24,667 \pm 0,199$
CRIII	Crocina	10,0	$24,333 \pm 0,199$

Fonte: Dados experimentais. Legenda: EP = erro padrão; n = 3 repetições por grupo com 25 oócitos cada (total de 75 oócitos por grupo). Análise estatística: Modelo Linear Geral (sem interações); Teste F para Tratamento:  $F(6,12) = 2,800$ ;  $P = 0,061$ ; Erro padrão comum = 0,199. Diferença significativa entre coletas ( $P = 0,024$ ); coleta 3 diferiu de coleta 1 e 2 ( $P < 0,05$ ; Teste de Duncan).

## 5.2 Extrusão do corpúsculo polar

A taxa de extrusão do corpúsculo polar foi significativamente influenciada pelos tratamentos antioxidantes ( $P < 0,001$ ), evidenciando um efeito marcante dos compostos utilizados durante a maturação *in vitro* dos oócitos bovinos. As médias dos mínimos quadrados indicaram que o grupo controle (C) apresentou a maior taxa de extrusão ( $22,667 \pm 0,882$ ), seguido pelos grupos AI (antocianina 0,2  $\mu\text{g/mL}$ ;  $20,000 \pm 0,882$ ) e AII (antocianina 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ;  $17,333 \pm 0,882$ ). Em contraste, os grupos AIII (antocianina 10  $\mu\text{g/mL}$ ) e CRIII (crocina 10  $\mu\text{g/mL}$ ) apresentaram as menores médias,  $10,333 \pm 0,882$  e  $8,333 \pm 0,882$ , respectivamente conforme a tabela 2.

O teste de comparações múltiplas de Duncan evidenciou diferenças estatísticas entre diversos grupos, destacando que concentrações elevadas de ambos os antioxidantes comprometeram significativamente a extrusão do corpúsculo polar em relação ao grupo controle. As concentrações intermediárias de crocina (CRII: 13,667) e antocianina (AII: 17,333) também apresentaram desempenho inferior ao controle, embora com redução menos acentuada.

Esses achados indicam que, apesar da manutenção da expansão do cópulo, os antioxidantes testados, especialmente em concentrações mais elevadas, podem interferir negativamente no processo de maturação nuclear dos oócitos, refletido na redução da extrusão do corpúsculo polar. Tal efeito sugere que o equilíbrio redox durante a MIV pode ser sensível à concentração de antioxidantes exógenos, comprometendo etapas críticas da maturação oocitária.

**Tabela 3.** Efeito de diferentes tratamentos antioxidantes sobre a taxa de extrusão do corpúsculo polar em oócitos bovinos submetidos à MIV (médias dos mínimos quadrados).

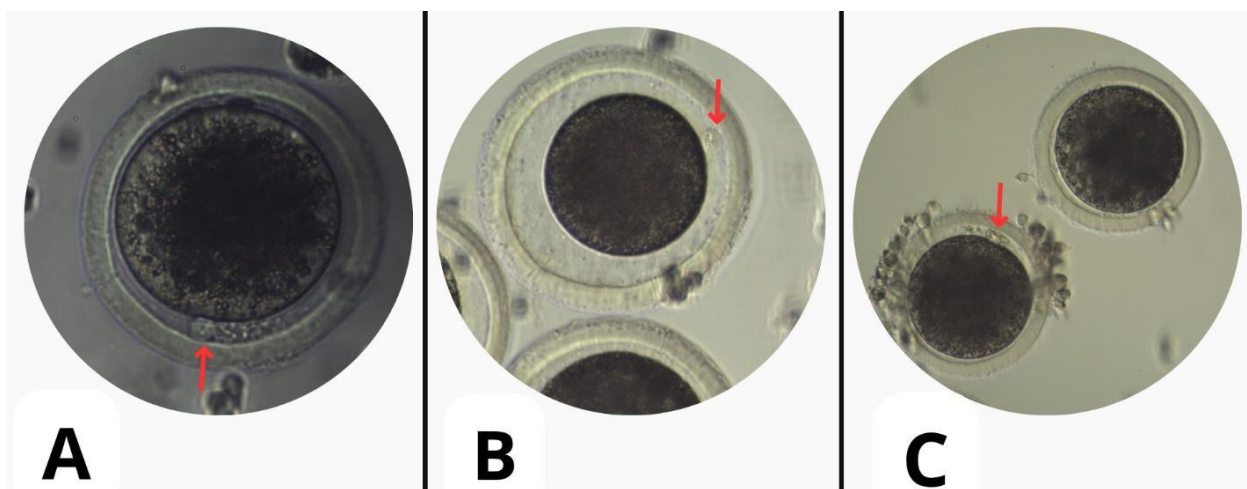
Grupo	Tratamento	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média $\pm$ EP
C	Controle	—	$22,667 \pm 0,882$
AI	Antocianina	0,2	$20,000 \pm 0,882$
AII	Antocianina	1,0	$17,333 \pm 0,882$
AIII	Antocianina	10,0	$10,333 \pm 0,882$
CRI	Crocina	0,5	$16,667 \pm 0,882$

Grupo	Tratamento	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	Média $\pm$ EP
CRII	Crocina	1,0	13,667 $\pm$ 0,882
CRIII	Crocina	10,0	8,333 $\pm$ 0,882

Fonte: Dados experimentais. Legenda: EP = erro padrão; n = 3 repetições por grupo com 25 oócitos cada (total de 75 oócitos por grupo). Análise estatística: Modelo Linear Geral (sem interações); Teste F para Tratamento:  $F(6, 12) = 33,796$ ;  $P < 0,001$  (significativo); Erro padrão comum = 0,882. Comparações múltiplas (Duncan): CRIII, AIII e CRII diferiram significativamente do grupo controle ( $P < 0,05$ ); AI não diferiu do controle.

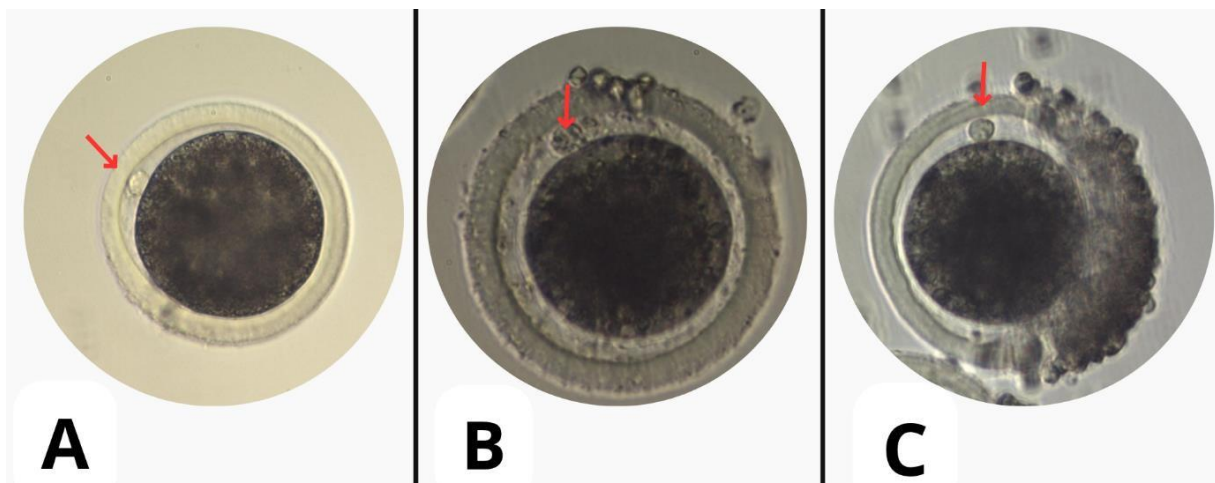
A extrusão do corpúsculo polar (CP) foi observada em todos os grupos, indicando progressão até a metáfase II da meiose, portanto a presença desses antioxidantes não interferiu na progressão da maturação nuclear.

**Figura 5** – Avaliação da extrusão do corpúsculo polar em oócitos bovinos desnudos após maturação in vitro com antocianina.



Oócitos com presença evidente do corpúsculo polar (CP) indicativo de sucesso na retomada da meiose até a metáfase II. (A) Grupo AI 0,2 $\mu\text{g/mL}$ ; (B) Grupo AII 1,0  $\mu\text{g/mL}$ . (C) Grupo AIII 10 $\mu\text{g/mL}$ . Fonte: Elaboração da autora (2025). Fonte: Elaboração da autora (2025).

**Figura 6** – Avaliação da extrusão do corpúsculo polar em oócitos bovinos desnudos após maturação in vitro com crocina



Oócitos com presença evidente do corpúsculo polar (CP), indicativo de sucesso na retomada da meiose até a metáfase II. (A) Grupo CRI 0,5 $\mu$ g/ml; (B) CR II 1,0  $\mu$ g/ml; (C) CR III 10 $\mu$ g/ml. Fonte: Elaboração da autora (2025).

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, observou-se que a adição de crocina e antocianina ao meio de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos não comprometeu a expansão das células do cúmulus, mas reduziu significativamente a extrusão do corpúsculo polar, principalmente nas maiores concentrações testadas. Tais resultados sugerem que, embora a morfologia do complexo cúmulo-oócito (CCO) tenha sido preservada, a maturação nuclear foi sensivelmente afetada.

A expansão do cúmulus está relacionada à produção de matriz extracelular por células do CCO, mediada principalmente por ácido hialurônico, prostaglandinas e pela ativação da via do AMPc (Turathum; Gao; Chian, 2021). A presença de antioxidantes no meio pode atenuar os efeitos nocivos do estresse oxidativo, promovendo a integridade celular e mantendo a expressão de genes associados à expansão, como *HAS2*, *PTGS2* e *TNFAIP6* (THONGKITTIDILOK *et al.*, 2022). Isso pode justificar os resultados positivos da expansão mesmo nos grupos tratados com elevadas concentrações de antioxidantes. A manutenção dessa expansão mesmo nas maiores doses indica que os antioxidantes empregados não interferiram com a função de secreção e comunicação parácrina no cúmulo, alinhando-se a evidências de que

antioxidantes em concentrações fisiológicas preservam o CCO sem comprometer sua integridade estrutural (MOKHBER MALEKI *et al.*, 2016).

Contudo, a redução na extrusão do corpúsculo polar observada nos grupos tratados com 10 µg/mL de crocina (CRIII) e antocianina (AIII) indica prejuízo na progressão meiótica. A extrusão do primeiro corpúsculo polar é um marcador de transição da metáfase I para a metáfase II, exigindo integridade do fuso meiótico, organização adequada dos microtúbulos e homeostase mitocondrial (Buratini *et al.*, 2023;Liang *et al.*, 2023 ;WANG *et al.*, 2021).

A crocina, um carotenoide derivado do açafrão (*Crocus sativus*), tem sido descrita como antioxidante eficaz em MIV, por reduzir EROs e preservar o conteúdo mitocondrial e a expressão de genes relacionados à competência oocitária, como *GDF9* e *BMP15* (Chen *et al.*, 2018). O estudo de Mokhber Maleki *et al.* (2016) demonstrou que a crocina exerce efeito positivo sobre a taxa de maturação *in vitro* (MIV) e o desenvolvimento subsequente de oócitos murinos, especialmente na concentração de 10 µg/mL. Contudo, os benefícios da crocina estiveram diretamente associados à presença intracelular de glutathiona (GSH), principal antioxidante endógeno envolvido na defesa redox e maturação citoplasmática. A adição de butionina sulfoximina (BSO), um inibidor da síntese de GSH, levou à depleção significativa deste antioxidante, comprometendo a maturação mesmo na presença da crocina, evidenciando que a ação protetora da crocina depende da integridade do sistema de defesa antioxidante celular. No presente estudo, os grupos tratados com 10 µg/mL apresentaram um padrão compatível com tais efeitos, com severa redução na extrusão do corpúsculo polar mesmo diante da manutenção da expansão do cúmulus. Por outro lado, doses muito elevadas de crocina (50–400 µg/mL) também não resultaram em benefícios, reforçando a hipótese de que a eficácia da crocina é dose-dependente e que concentrações supratrapêuticas podem ser ineficazes ou até prejudiciais.

As antocianinas, por sua vez, são flavonoides com reconhecida atividade antioxidante e anti-inflamatória. Em oócitos bovinos, Sakatani *et al.* (2007) investigou os efeitos das antocianinas extraídas da batata-doce roxa (*Ipomoea batatas*) sobre o desenvolvimento embrionário bovino pré-implantação em condições de estresse

térmico. Os autores relataram que a suplementação com antocianinas durante a cultura *in vitro* resultou em aumento na taxa de desenvolvimento até o estágio de blastocisto e melhora no estado redox intracelular dos embriões submetidos a choque térmico. Esse comportamento bifásico — antioxidante em baixas doses e pró-oxidante em altas — já foi descrito na literatura para diversos compostos fenólicos, devido à sua capacidade de gerar espécies reativas em presença de metais redoxativos como o ferro e o cobre (GALATI; O'BRIEN, 2004).

De forma semelhante, estudos em oócitos ovinos revelaram que o uso de antioxidantes como melatonina (30  $\mu\text{M}$ ), vitamina C (100  $\mu\text{M}$ ) e  $\alpha$ -tocoferol (100  $\mu\text{M}$ ) durante a maturação *in vitro* foi eficaz na redução da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Esses compostos também induziram a elevação nas taxas de blastocisto, com efeitos associados a alterações na expressão de genes envolvidos no estresse oxidativo e na regulação do crescimento oocitário, como GDF9, BMP15, SOD1 e BCL-2 (Tripathi et al., 2023).

Esses resultados indicam que, independentemente da espécie, o uso de antioxidantes naturais pode modular vias moleculares críticas para o sucesso da MIV, melhorando não apenas a maturação nuclear e citoplasmática, mas também a competência para o desenvolvimento embrionário. Portanto, a avaliação da crocina e da antocianina como antioxidantes naturais em oócitos bovinos revela-se alinhada com as evidências disponíveis na literatura, embora suas ações moleculares específicas ainda demandem investigação aprofundada.

## 7 CONCLUSÃO

A presente pesquisa demonstrou que a adição dos antioxidantes naturais crocina e antocianina ao meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos interferiu significativamente nos eventos de maturação oocitária, avaliados por meio da expansão do complexo cumulus-oócito (COC) e pela extrusão do corpúsculo polar (CP). Embora todos os grupos experimentais tenham apresentado graus de expansão do cúmulus comparáveis ao grupo controle, indicando atividade parácrina preservada entre as células do cúmulo e o oócito, a taxa de extrusão do CP foi significativamente

reduzida nos grupos tratados com os antioxidantes, especialmente nas concentrações mais elevadas.

Tais achados sugerem que, apesar do potencial antioxidante dessas substâncias, sua utilização em determinadas concentrações pode comprometer a progressão da maturação nuclear. Esse efeito possivelmente decorre de desequilíbrios na sinalização redox intracelular, que desempenha papel fundamental na reativação meiótica e na organização do fuso mitótico. A literatura já aponta efeitos semelhantes de outros compostos antioxidantes naturais em diferentes espécies, reforçando a complexidade dose-dependente do uso dessas moléculas na MIV.

Portanto, este estudo destaca a necessidade de pesquisas para elucidar os mecanismos moleculares subjacentes às ações da crocina e da antocianina durante a maturação oocitária, bem como para definir concentrações fisiologicamente seguras e eficazes. Esses dados são fundamentais para o aprimoramento das biotécnicas da reprodução assistida, visando a otimização da competência oocitária e dos índices de sucesso em programas de produção in vitro de embriões bovinos.

## 8 REFERÊNCIAS

AGARWAL, Ashok; GUPTA, Sajal; SHARMA, Rakesh K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 28, 2005., DOI: [10.1186/1477-7827-3-28](https://doi.org/10.1186/1477-7827-3-28)

AGARWAL, Ashok; SALEH, Ramadan A.; BEDAIWY, Mohamed A. Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. **Fertility and Sterility**, v. 79, n. 4, p. 829–843, 1 abr. 2003. DOI: [10.1016/s0015-0282\(02\)04948-8](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)04948-8)

APPELTANT, R. *et al.* Interactions between oocytes and cumulus cells during in vitro maturation of porcine cumulus-oocyte complexes in a chemically defined medium: Effect of denuded oocytes on cumulus expansion and oocyte maturation. **Theriogenology**, v. 83, n. 4, p. 567–576, 2015. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2014.10.026](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2014.10.026)

BRITT, Jack H. Oocyte development in cattle: physiological and genetic aspects. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. spe, p. 110–115, jul. 2008. <https://doi.org/10.1590/S1516-35982008001300013>

BROWN, Hannah M. *et al.* Failure to launch: aberrant cumulus gene expression during oocyte in vitro maturation. **Reproduction**, v. 153, n. 3, p. R109–R120, 2017. DOI: [10.1530/REP-16-0426](https://doi.org/10.1530/REP-16-0426)

BURATINI, Jose *et al.* Oocyte secreted factors control genes regulating FSH signaling and the maturation cascade in cumulus cells: the oocyte is not in a hurry. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 40, n. 8, p. 1961–1971, 2023. DOI: [10.1007/s10815-023-02822-y](https://doi.org/10.1007/s10815-023-02822-y)

CHEN, Xuan *et al.* Crocin supplementation during oocyte maturation enhances antioxidant defense and subsequent cleavage rate. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 54, 1 out. 2018.

DE OLIVEIRA SANTOS, Maria Valéria *et al.* Use of natural antioxidants in in vitro mammalian embryo production. **Semina: Ciências Agrárias** Universidade Estadual de Londrina, 1 jan. 2018

FARKHONDEH, Tahereh *et al.* Os efeitos protetores da crocina no tratamento de doenças neurodegenerativas: uma revisão. **American Journal of Neurodegenerative Disease**, v. 7, n. 1, p. 1, 2018. DOI: [PMC5840286](https://doi.org/PMC5840286)

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: Significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 287–303, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.04.034>.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Rev Bras Reprod Anim. v. 33, n. 2, p. 82–94, abr. 2009.

GUEMRA, S. *et al.* 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, dez. 2013. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000600005>

GUÉRIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v. 7, n. 2, p. 175–189, 1 mar. 2001. DOI: [10.1093/humupd/7.2.175](https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175)

HE, Jian; GIUSTI, M. Monica. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. Volume 1, 2010, p. 163–187, 2010.

KHAZAEI, Mozafar; AGHAZ, Faranak. 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.

KONG, Jin-Ming *et al.* Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923–933, 2003. DOI: [10.1016/s0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(03)00438-2)

LIANG, Junzhi *et al.* Reactive oxygen species and ovarian diseases: Antioxidant strategies. **Redox Biology**, v. 62, p. 102659, 2023.

LIU, Jiaqi *et al.* Anthocyanins: Promising Natural Products with Diverse Pharmacological Activities. **Molecules**, v. 26, n. 13, 2021. DOI: [10.3390/molecules26133807](https://doi.org/10.3390/molecules26133807)

LONERGAN, Pat; FAIR, Trudee. The ART of studying early embryo development: Progress and challenges in ruminant embryo culture. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 49–55, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.021>

MOKHBER MALEKI, Elham *et al.* Effects of Crocin Supplementation during In Vitro Maturation of Mouse Oocytes on Glutathione Synthesis and Cytoplasmic Maturation. **International Journal of Fertility and Sterility**, v. 10, n. 1, p. 53–61, 2016. [10.22074/ijfs.2016.4769](https://doi.org/10.22074/ijfs.2016.4769)

MORI, Tadashi; AMANO, Tomoko; SHIMIZU, Hiroshi. Roles of Gap Junctional Communication of Cumulus Cells in Cytoplasmic Maturation of Porcine Oocytes Cultured In Vitro. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 4, p. 913–919, 1 abr. 2000. DOI: [10.1095/biolreprod62.4.913](https://doi.org/10.1095/biolreprod62.4.913)

PEETINARAK, Duangrudee *et al.* Efeitos da suplementação de crocina durante o cultivo in vitro de embriões de camundongos de quatro células intactos e semidestruídos. **JBRA Assisted Reproduction**, v. 27, n. 4, p. 619, 2023.. doi: [10.5935/1518-0557.20230050](https://doi.org/10.5935/1518-0557.20230050)

POURMOUSAVI, Laleh *et al.* Potential therapeutic effects of crocin. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 397, n. 10, p. 7395–7420, 2024.

RAKHA, Shimaa I. *et al.* Importance of Antioxidant Supplementation during In Vitro Maturation of Mammalian Oocytes. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 8, 2022. <https://doi.org/10.3390/vetsci9080439>

READER, Karen L.; STANTON, Jo-Ann L.; JUENGEL, Jennifer L. The Role of Oocyte Organelles in Determining Developmental Competence. **Biology**, v. 6, n. 3, 2017. <https://doi.org/10.3390/biology6030035>

RIZOS, Dimitrios *et al.* Consequences of in vitro culture conditions on embryo development and quality. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, p. 44-50, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01230.x>

SIRARD, M. A. Factors Affecting Oocyte and Embryo Transcriptomes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. s4, p. 148–155, 2012.

SOMFAI, Tamás *et al.* Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: Effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage. **Cryobiology**, v. 55, n. 2, p. 115–126, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2007.06.008>

THONGKITTIDILOK, C. *et al.* Effects of individual or in-combination antioxidant supplementation during in vitro maturation culture on the developmental competence and quality of porcine embryos. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 57, n. 3, p. 314–320, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1111/rda.14063>.

TRIPATHI, S. K. *et al.* Antioxidants supplementation improves the quality of in vitro produced ovine embryos with amendments in key development gene expressions. **Theriogenology**, v. 201, p. 41–52, 2023. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2022.11.048>

TURATHUM, Bongkoch; GAO, Er-Meng; CHIAN, Ri-Cheng. The Function of Cumulus Cells in Oocyte Growth and Maturation and in Subsequent Ovulation and Fertilization. **Cells**, v. 10, n. 9, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10092292>

WANG, Li-Shu; STONER, Gary D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, v. 269, n. 2, p. 281–290, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.020>

YOU, Jinyoung *et al.* Anthocyanin stimulates in vitro development of cloned pig embryos by increasing the intracellular glutathione level and inhibiting reactive oxygen species. **Theriogenology**, v. 74, n. 5, p. 777–785, 2010. DOI: [10.1016/j.theriogenology.2010.04.002](https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.04.002)