







Ácido Trans-ferúlico na maturação *in vitro* de zigotos ovinos

Trans-ferulic acid on the in vitro maturation of ovine zygotes

Andreza Mayara Carneiro de Lima¹ , Luana Kealy Pimentel de Oliveira^{1*} , Érika Karoline de Oliveira Aureliano¹ , Damaris Raquel Pires dos Santos¹ , Beatriz Cavalcanti de Freitas¹ , William Matheus Souza¹ , Jossimara de Melo Silva¹ , Ailton Batista Pereira¹ , Sueli de Oliveira Lima¹ , Isabela Maria Lopes¹ , Bruna Moura Silva¹ , Thaís Thatiane dos Santos Souza² , Mabel Freitas Cordeiro¹ , Edilson Soares Lopes Júnior¹ 

¹ Colegiado de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, Brasil.

² Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), Petrolina-PE, Brasil.

*Autora para correspondência: luanakealy1@gmail.com

Informações do artigo

Palavras-chave

Antioxidante
Fecundação *in vitro*
Maturação *in vitro*
Ovelha

DOI

10.26605/medvet-v18n3-6502

Citação

Lima, A. M. C., Oliveira, L. K. P., Aureliano, E. K. O., Santos, D. R. P., Freitas, B. C., Souza, W. M., Silva, J. M., Pereira, A. B., Lima, S. O., Lopes, I. M., Silva, B. M., Souza, T. T. S., Cordeiro, M. F., Lopes Júnior, E. S. (2024). Ácido Trans-ferúlico na maturação *in vitro* de zigotos ovinos. *Medicina Veterinária*, 18(3), 259-264. <https://doi.org/10.26605/medvet-v18n3-6502>

Recebido: 08 de dezembro de 2023

Aceito: 17 de julho de 2024



Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar o uso do ácido trans-ferúlico (ATF) na maturação *in vitro* de oócitos e na produção *in vitro* de embriões ovinos. Para isso, oócitos foram divididos em cinco grupos de tratamento: o grupo controle (CON), no qual oócitos foram imersos em meio sem utilização de antioxidantes, já no grupo cisteamina (CIS), os oócitos foram incluídos no mesmo meio do grupo CON, mas contendo 100µM de cisteamina como fonte antioxidante; nos grupos ATF10, ATF50 e ATF100, os oócitos foram incluídos no mesmo meio do grupo CON, mas contendo 10µM, 50µM e 100µM de ácido trans-ferúlico, respectivamente. A maturação *in vitro* (MIV) foi realizada por 24h, a 38,5°C, com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Em seguida, foi realizada a fecundação *in vitro* (FIV), seguido de cultivo *in vitro* (CIV) dos presumíveis zigotos, o qual ocorreu em meio fluido sintético de oviduto (SOF) com 2mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), sendo avaliada a taxa de estruturas clivadas após 48h de cultivo. Os dados foram apresentados em porcentagem e foi utilizado o teste de Qui-quadrado no software Epi Info®. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. Foi possível observar que em relação a taxa de expansão o ATF100 se mostrou superior ao ATF10, CIS e CON (95,3%; 76,7%; 79,1%; 81,4%). Para grau de expansão das células do cumulus, número de presumíveis zigotos e número de estruturas clivadas, não houve diferença significativa entre os grupos com ácido trans-ferúlico (ATF10, ATF50 e ATF100) e cisteamina (CIS). Sendo possível concluir que o ácido trans-ferúlico é uma alternativa à cisteamina como agente antioxidante no meio de maturação *in vitro* de oócitos ovinos.

Abstract

This work aimed to evaluate the use of trans-ferulic acid (ATF) in the *in vitro* maturation of oocytes and in the *in vitro* production of ovine embryos. For this, oocytes were divided into five treatment groups: the control (CON) group, in which oocytes were immersed in medium without the use of antioxidants, while in the cysteamine (CIS) group, the oocytes were included in the same medium as the CON group, but containing 100µM of cysteamine as an antioxidant source; in the ATF10, ATF50, ATF100 groups, the oocytes were included in the same medium as in the CON group, but containing 10µM, 50µM and 100µM trans-ferulic acid, respectively. *In vitro* maturation (IVM) was performed for 24h, at 38.5°C, with 5% of carbon dioxide (CO₂). Then, *in vitro* fertilization (IVF) was performed, followed by *in vitro* culture (IVC) of the presumed zygotes, which occurred in synthetic oviductal fluid (SOF) medium with 2mg/mL of bovine serum albumin (BSA), evaluating the rate of cleaved structures after 48h of cultivation. Data were presented in percentages and the Chi-square test was used in the Epi Info® software. The results were considered significant when $p < 0.05$. It was possible to observe that about the expansion rate, ATF100 was superior to ATF10, CIS, and CON (95.3%; 76.7%; 79.1%; 81.4%). For the expansion degree of cumulus cells, the number of presumed zygotes, and the number of cleaved structures, there was no significant difference between the groups with trans-ferulic acid (ATF10, ATF50, and ATF100) and cysteamine (CIS). It is possible to conclude that trans-ferulic acid is an alternative to cysteamine as an antioxidant agent in the *in vitro* maturation medium of ovine oocytes.

Keywords: Antioxidant; *in vitro* fertilization; *in vitro* maturation; sheep.

1 | Introdução

A produção in vitro (PIV) de embriões é uma biotécnica da reprodução que possibilita acelerar o ganho genético e aumentar o potencial produtivo dos animais. Caracterizada por três etapas: maturação in vitro (MIV) e fecundação in vitro (FIV) de oócitos, assim como o cultivo in vitro (CIV) de embriões, os quais serão destinados à transferência direta para o útero da fêmea receptora ou para criopreservação (Zhu et al., 2018), sendo a MIV considerada a etapa mais complexa da PIV visto que envolve vários fatores estruturais e bioquímicos que podem vir a influenciar nas etapas posteriores, como a FIV (Gorczyca et al., 2022). Durante o processo, mediante as condições fornecidas, ocorre o aumento desproporcional das espécies reativas de oxigênio (ERO), sendo assim, fundamental a adição complementar de substâncias antioxidantes ao meio de MIV (Sánchez-Ajofrín et al., 2020).

Os antioxidantes são os principais fatores de defesa oocitária durante a MIV e, por isso, são bem-vistos por muitos pesquisadores, pois os mesmos são responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelo estresse oxidativo, que, por sua vez, é resultante de vários processos do metabolismo normal das células, e quando em desequilíbrio com as substâncias antioxidantes, tende a aumentar, favorecendo o desenvolvimento de lesões e destruição da membrana plasmática. O estresse oxidativo danifica os embriões por levar à peroxidação dos fosfolípidios de membrana e à alteração de grande parte dos tipos de moléculas celulares, tais como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (Zabihi et al., 2021).

Os principais antioxidantes enzimáticos são a catalase, superóxido dismutase (SOD) e a glutathiona (GSH), sendo essa última, presente em maior quantidade nos oócitos, quando comparada com as outras enzimas antioxidantes, tornando-a o principal mecanismo de defesa oocitária contra as ERO (Ren et al., 2021). Apesar dos efeitos antioxidantes exercidos pela glutathiona nos oócitos durante o processo de MIV, foi observado que ela, de forma isolada, não é capaz de debelar as ERO e, dessa forma, é fundamental a adição exógena de substâncias antioxidantes não enzimáticas (Wang et al., 2021), como por exemplo, o ácido trans-ferúlico (ATF).

O ATF é um composto fenólico pertencente à classe dos ácidos hidroxicinâmicos, é caracterizado por possuir um anel benzênico, com um grupo

hidroxi e um metóxi, ligado aos carbonos 3 e 4 do ácido propenóico. Tem atraído a atenção por sua capacidade antioxidante e benefícios à saúde. Ao ser adicionado no meio de maturação de oócitos suínos, o ATF promoveu o aumento no potencial antioxidante na taxa de maturação, fecundação, e formação de blastocisto (Tanihara et al., 2018).

Contudo, ainda são escassos os estudos sobre a utilização do ATF nos meios de MIV de oócitos ovinos em relação à maturação e produção de embriões in vitro. Dessa maneira, é relevante que seja estudada a função desse poderoso antioxidante nos oócitos, a fim de buscar melhorias para essa biotécnica tão importante que é a PIV. Com isso, o objetivo desse trabalho foi avaliar o uso do ácido trans-ferúlico na maturação in vitro de oócitos e na produção in vitro de embriões ovinos.

2 | Material e Métodos

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich Corporation). O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), do Campus de Ciências Agrárias, na Universidade Federal do Vale do São Francisco, em Petrolina-PE, no período de agosto de 2020 a agosto de 2021.

Para a colheita de oócitos, ovários foram obtidos do Abatedouro Frigorífico de Caprinos e Ovinos do distrito de Rajada, município de Petrolina-PE, imediatamente após o abate. Os ovários foram transportados até o LAFIBRA, dentro de 1 hora, em solução de cloreto de sódio (NaCl) 0,9%, contendo 0,05g de pentabiótico/L, sendo o pentabiótico composto por estreptomicina básica, dihidroestreptomicina básica, benzilpenicilina benzatina, benzilpenicilina procaína e benzilpenicilina potássica, a uma temperatura de 33°C a 34°C, em garrafa térmica. No LAFIBRA, os ovários foram lavados, três vezes, em solução salina aquecida, retirados os tecidos adjacentes e mantidos em banho-maria, a 34°C. Para a colheita dos oócitos, foi utilizada bomba de vácuo, a uma pressão de 5mL/min, linha de aspiração e uma agulha 18G. O meio de recuperação foi TCM199®, com 25mM de HEPES®, suplementado com 5UI/mL de heparina sódica, 500UI de penicilina, 0,5mg de estreptomicina, 1,25µg de anfotericina B e 1% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Logo após a colheita, os complexos cumulus-oócitos (CCOs) dispostos no fluido folicular foram vertidos em placas de petri de

100mm, analisados sob estereomicroscópio e classificados de acordo com Freitas e Melo (2010), sendo selecionados para a MIV apenas os de graus I e II.

Um total de 215 oócitos CCOs selecionados foram igualmente divididos em cinco grupos de maturação: grupo CON, os CCOs foram imersos em meio MIV, composto de TCM-199®, suplementado com 500UI de penicilina, 0,5mg de estreptomicina, 1,25µg de anfotericina B, 0,2mM de piruvato de sódio, 10%(v/v) de soro fetal bovino (SFB), 10ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF), 10µg/mL de hormônio folículo-estimulante (FSH), 10µg/mL de hormônio luteinizante (LH) e 1µg/mL de estradiol (Aureliano et al., 2023); já no grupo CIS, os CCOs foram inclusos no mesmo meio do grupo CON, mas contendo 100µM de cisteamina; nos grupos ATF10, ATF50 e ATF100, os CCOs foram inclusos no mesmo meio do grupo CON, mas contendo 10µM, 50µM e 100µM de ácido trans-ferúlico (ATF), respectivamente. As gotas de MIV com os CCOs foram cobertas com óleo mineral e incubados durante 24 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, em atmosfera umidificada, com 5% de dióxido de carbono (CO₂). Ao final do processo de maturação, os CCOs maduros foram avaliados quanto ao grau de expansão das células do cumulus (CC), classificando-os em: total (grau 1), moderado (grau 2) e leve (grau 3), conforme a metodologia de Aghaz et al. (2015).

A fecundação *in vitro* dos oócitos maduros foi realizada com sêmen fresco, que foi colhido através de vagina artificial, a partir de carneiro com fertilidade comprovada. O ejaculado foi disposto em cima de uma coluna de Percoll® 45%/90%. Os espermatozoides móveis foram selecionados por centrifugação, a 700G, por 15 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 2mL de meio de FIV (SOF®, suplementado com 500UI de penicilina, 0,5mg de estreptomicina, 1,25µg de anfotericina B, 10µg/mL de hipotaurina, 1 µg/mL de heparina sódica e 10%(v/v) de soro de ovelha em estro), e lavado por centrifugação (100G; 5 minutos). O novo precipitado foi ressuspensão em 2mL de meio FIV. Após aferição da concentração espermática total, a concentração final foi ajustada para 1x10⁶ espermatozoides/mL, no volume total de 50µL/gota de meio de fecundação *in vitro* (FIV), em placa de petri de 100mm, sob óleo mineral. Os oócitos maduros, em número de 10 unidades por gota, seguiram para FIV, onde foram inclusos, juntamente com os espermatozoides selecionados e capacitados, em gotas de 50µL de meio FIV. A FIV foi realizada por um período de 18 a 20 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, contendo 5%

de CO₂. Os presumíveis zigotos foram avaliados quanto a presença do 2º corpúsculo polar no espaço perivitelínico, utilizando, para tanto, um microscópio invertido (TS100®, NIKON, Japão).

Após avaliação, os presumíveis zigotos seguiram para o cultivo *in vitro* de embriões (CIV), com meio SOF suplementado com 3mg/mL de albumina sérica bovina (BSA) e foram avaliadas clivagens no D1 e D2. As condições do CIV foram as mesmas utilizadas na MIV e FIV.

Os resultados foram expressos em porcentagem e comparados usando o teste qui-quadrado no software Epi Info® (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). As diferenças foram consideradas significativas quando os valores de *p* foram <0,05.

3 | Resultados e Discussão

Com relação à taxa de expansão, no grupo ATF100 foi observado uma maior proporção de CCO expandidos quando comparado aos grupos CON, CIS e ATF10 (*p*<0,05), não apresentando diferença significativa em relação ao grupo ATF50 (*p*>0,05) (Tabela 1). Já com relação aos graus de expansão, não houve diferença significativa entre grupos de tratamento, dentro de cada grau avaliado (total; moderado; leve). Da mesma forma, porém comparando os graus de expansão, dentro de cada grupo de tratamento, não foi verificada diferença significativa entre os graus de expansão (*p*>0,05), com exceção do grupo CIS, onde a proporção de CCO com expansão moderada se mostrou maior do que com aquela de CCO com expansão total (*p*<0,05) (Tabela 1).

Com base nos resultados experimentais, pode-se perceber que o efeito antioxidante do ácido trans-ferúlico apresenta taxas de expansão similares à cisteamina nas condições testadas, no qual o grupo ATF100 se mostrou superior em relação a taxa de expansão. A explicação para esse fato é que o ATF tem o grupo de ácido carboxílico que age evitando que os radicais livres danifiquem a membrana celular, através da peroxidação lipídica pela ligação da bicamada lipídica da membrana celular (Srinivasan, et al., 2007). Já a cisteamina, age sendo convertida em cisteína, que é amplamente utilizada pelos oócitos e embriões. No entanto, este aminoácido é molecularmente instável no meio extracelular, passando a ser convertida em cistina. E a cistina é, por sua vez, de extrema importância para o aumento da

síntese de GSH, o que resulta em melhor viabilidade oocitária (Takahashi, 2012).

Lee e Hyun (2017), que estudaram os efeitos da suplementação de ácido ferúlico durante a maturação *in vitro* de oócitos suínos em seu desenvolvimento partenogenético, demonstraram que a concentração de 20µM de AF diminuiu o nível

de ERO intracelular cerca de 4 vezes, quando comparado ao grupo controle. Quando radicais como ERO são presentes, o ácido ferúlico pode se combinar com átomos de hidrogênio do radical para formar radicais fenoxi estabilizados por ressonância, que são responsáveis por uma potente atividade antioxidante (Kensler et al., 2007).

Tabela 1. Graus de expansão de células do cumulus (%) de oócitos ovinos maturados *in vitro* sem a presença de antioxidantes (CON) ou na presença de cisteamina (CIS) ou de ácido trans-ferúlico (ATF10; ATF50; ATF100)

| Grupos | Nº de CCOs I e II | Taxa de expansão % (n) | Grau de expansão % (n) | | |
|--------|-------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| | | | Total | Moderado | Leve |
| CON | 43 | 81,4 (35/43) ^{bc} | 28,6 (10/35) ^{aA} | 37,1 (13/35) ^{aA} | 34,3 (12/35) ^{aA} |
| CIS | 43 | 79,1 (34/43) ^{bc} | 23,5 (8/34) ^{aB} | 47,1 (16/34) ^{aA} | 29,4 (10/34) ^{aAB} |
| ATF10 | 43 | 76,7 (33/43) ^c | 30,3 (10/33) ^{aA} | 24,2 (8/33) ^{aA} | 45,5 (15/33) ^{aA} |
| ATF50 | 43 | 93,0 (40/43) ^{ab} | 25,0 (10/40) ^{aA} | 40,0 (16/40) ^{aA} | 35,0 (14/40) ^{aA} |
| ATF100 | 43 | 95,3 (41/43) ^a | 24,4 (10/41) ^{aA} | 36,6 (15/41) ^{aA} | 39,0 (16/41) ^{aA} |

^{a,b,c} Letras minúsculas indicam diferenças na mesma coluna ($p < 0,05$). ^{A,B,C} Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma linha ($p < 0,05$). CON: controle; CIS: cisteamina; ATF: ácido trans-ferúlico; CCOs: complexos cumulus-oócitos.

No entanto, com relação aos graus de expansão, não houve diferença significativa entre grupos de tratamento, dentro de cada grau avaliado (total, moderado, leve). Contudo, quando comparados os tratamentos, o CIS demonstrou menor proporção de estruturas com expansão total quando comparado àqueles de grau moderado, podendo ser um indicativo que o número de replicatas foi baixo, sendo necessário um número maior de sessões para uma melhor avaliação da substância na MIV.

Outra possível explicação para os nossos resultados é o protocolo utilizado do nosso grupo de pesquisa, em que todos os grupos de tratamento tinham substâncias que podem ter influenciado na maturação, assim como o fator de crescimento epidermal (EGF) e o estradiol. O EGF apresenta estímulo da síntese de glutathione intracelular oocitária, regulando a maturação através do estímulo da expansão das células do cumulus, melhorando a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos (Whitaker e Knight, 2004).

Além disso, a composição dos meios das espécies ovina e suína são semelhantes, porém nota-se que em meios utilizados para espécie suína, necessita-se de uma maior suplementação de hormônios e fatores de crescimento quando comparado aos meios da espécie ovina. Para

identificar melhor os efeitos do ATF na maturação de oócitos ovinos são necessárias mais avaliações, como, por exemplo, a avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio.

Foi avaliado o efeito do ATF no número de presumíveis zigotos e estruturas clivadas após a fecundação *in vitro*. No entanto, não foi observada diferença significativas entre os tratamentos testados (Tabela 2).

Em relação aos dados sobre formação de presumíveis zigotos com observação do segundo corpúsculo polar no espaço perivitelínico após a fecundação *in vitro* e desnudamento, foram observadas estruturas clivadas com mais de duas células no tratamento ATF50 e ATF100, se mostrando uma possível opção para produção *in vitro* de embriões ovinos.

Apesar de não ter uma diferença significativa em relação à porcentagem de presumíveis zigotos no presente trabalho, é possível observar uma tendência de crescimento do número de presumíveis zigotos no tratamento ATF50 e ATF100, assim como na taxa de estruturas clivadas. A explicação para não haver diferença em nosso estudo, nesse parâmetro, pode estar relacionada a um número baixo de repetições, resultando em baixo número de oócitos que seguiram para a fecundação.

Dessa forma, obtivemos resultados diferentes daqueles demonstrados por Tanihara et al. (2018), que estudou o ATF na maturação de oócitos suínos, os quais encontraram, em relação à fecundação de oócitos e formação de clivagem, que o tratamento usando a concentração de 10 μ M de ATF durante a MIV, demonstrou resultados significativamente maiores em comparação aos demais tratamentos testados. Sabe-se que nos

processos *in vitro* há o aumento de danos aos oócitos e embriões, o que reduz a viabilidade destes. Um dos principais fatores que causam esses danos na espécie ovina é o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) (Rodríguez-Suástegui et al., 2017), derivado de um desequilíbrio com antioxidantes embrionários endógenos e que causam lesões, levando a célula a entrar em processo apoptótico.

Tabela 2. Taxa de presumíveis zigotos e estruturas clivadas (%) após fecundação *in vitro* de oócitos maturados sem a presença de antioxidantes (CON), com cisteamina (CIS) e na presença de ácido trans-ferúlico (ATF10; ATF50; ATF100)

| Tratamentos | Oócitos maturados | % de presumíveis Zigotos | % de clivados |
|-------------|-------------------|---------------------------|---------------------------|
| CON | 43 | 23,3 (10/43) ^a | 37,2 (16/43) ^a |
| CIS | 43 | 20,9 (9/43) ^a | 23,3 (10/43) ^a |
| ATF10 | 43 | 16,3 (7/43) ^a | 34,9 (15/43) ^a |
| ATF50 | 43 | 30,2 (13/43) ^a | 39,5 (17/43) ^a |
| ATF100 | 43 | 27,9 (12/43) ^a | 41,9 (18/43) ^a |

^a Letra minúscula indica diferença na mesma coluna ($p < 0,05$). CON: controle; CIS: cisteamina; ATF: ácido trans-ferúlico.

Dessa maneira, é possível supor que o ATF age de forma importante como antioxidante, diminuindo as espécies reativas de oxigênio e, dessa forma, diminuindo os genes causadores do apoptose, melhorando, assim, os resultados relacionados à maturação e fecundação oocitária, clivagem e formação de blastocisto, já que tem a capacidade de interrupção de cadeia de radicais livres, em especial a capacidade de neutralizar os principais tipos de radicais livres, além e regular e restaurar enzimas que estão envolvidas no combate ao estresse oxidativo (Mancuso e Santangelo, 2014).

4 | Conclusão

A adição de 100 μ M de ácido trans-ferúlico melhora a taxa de expansão de células do cumulus e promove taxas semelhantes de presumíveis zigotos e de estruturas clivadas quando comparado a utilização do antioxidante cisteamina.

São necessários mais estudos para que seja visto o real efeito do ácido trans-ferúlico na maturação *in vitro* de oócitos ovinos, através do uso de outras avaliações, a fim de identificar como age o ácido trans-ferúlico na maturação de oócitos ovinos.

5 | Declaração de Conflito de Interesse

Os autores declaram não existir conflito de interesse.

6 | Comitê de Ética

O presente trabalho respeitou os princípios éticos da experimentação e bem-estar animal. Atividades estas que foram devidamente avaliadas e aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas da Universidade Federal do Vale do São Francisco, com o seguinte número de protocolo: 0005/261120.

7 | Referências

Aghaz, F.H.; Hajarian, H.; Shabankareh, K.; Abdolmohammadi, A. Effect of sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion, oocyte nuclear maturation, and subsequent embryo development in Sanjabi ewes during the breeding season. **Theriogenology**, 84(9): 1631-1635, 2015.

Aureliano, E.K.D.O.; Lima, A.M.C.; Santos, D.R.P.; Freitas, B.C.D.; Silva, J.D.M., Oliveira, L.K.P.; Lima, S.D.O.; Pereira, A.B.; Lopes, I.M.;

Silva, B.M.; Cordeiro, M.F.; Lopes-Júnior, E.S. Efeito do mio-inositol na produção *in vitro* de embriões ovinos. **Revista de Veterinária e Zootecnia**, 30: 1-7, 2023.

Gorczyca, G.; Wartalski, K.; Romek, M.; Samiec, M.; Duda, M. The molecular quality and mitochondrial activity of porcine cumulus-oocyte complexes are affected by their exposure to three endocrine-active compounds under 3D *in vitro* maturation conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, 23(9): 4572-4607, 2022

Kensler, T.W.; Wakabayashi, N.; Biswal, S. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 47: 89-116, 2007.

Lee, K.; Hyun, S. The beneficial effects of ferulic acid supplementation during *in vitro* maturation of porcine oocytes on their parthenogenetic development. **Journal of Embryo Transfer**, 32(4): 257-265, 2017.

Mancuso, C. e Santangelo, R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, 65: 185-195, 2014.

Ren, J.; Hao, Y.; Liu, Z.; Li, S.; Wang, C.; Wang, B.; Liu, Y.; Liu, G.; Dai, Y. Effect of exogenous glutathione supplementation on the *in vitro* developmental competence of ovine oocytes. **Theriogenology**, 173: 144-155, 2021.

Rodríguez Suástegui, J.L.; Romo García, S.D.; Casas Hernández, E.; Hernández Pichardo, J.E. Desarrollo de mórulas de ovino en medio simple o secuencial: Relación entre evaluación morfológica y viabilidad embrionaria. **Revista de Salud Animal**. 39(1): 9-18, 2017.

Sánchez-Ajofrín, I.; Iniesta-Cuerda, M.; Sánchez-Calabuig, M.J.; Peris-Frau, P.; Martín-Maestro, A.; Ortiz, J.A.; Fernández-Santos, M.D.R.; Garde, J.J.; Gutiérrez-Adán, A.; Soler, A.J. Oxygen tension during *in vitro* oocyte maturation and fertilization affects embryo quality in sheep and deer. **Animal Reproduction Science**, 213: 1-10, 2020.

Srinivasan, M.; Sudheer, A. R.; Menon, V. P. Ferulic acid: therapeutic potential through its antioxidant property. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 40(2): 92-100, 2007.

Tanihara, F.; Hirata, M.; Nhien, N.; Hirano, T.; Kuniyama, T.; Otoi, T. Effect of ferulic acid supplementation on the developmental

competence of porcine embryos during *in vitro* maturation. **Journal of Veterinary Medical Science**, 80(6): 1007-1011, 2018.

Takahashi, M.S.R.D. Innovative Technology Award 2011 Oxidative stress and redox regulation on *in vitro* development of mammalian embryos. **Journal of Reproduction and Development**, 58(1): 1-9, 2012.

Wang, L.; Tang, J.; Wang, L.; Tan, F.; Song, H.; Zhou, J.; Li, F. Oxidative stress in oocyte aging and female reproduction. **Journal of Cellular Physiology**, 236(12): 7966-7983, 2021.

Whitaker, B. D.; Knigh, J. W. Exogenous γ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and embryos parameters of porcine oocytes and embryos. **Theriogenology**, 62: 311-322, 2004.

Zabihi, A.; Shabankareh, H.K.; Hajarian, H.; Foroutanifar, S. *In vitro* maturation medium supplementation with resveratrol improves cumulus cell expansion and developmental competence of Sanjabi sheep oocytes. **Livestock Science**, 243: 1-7, 2021.

Zhu, J.; Moawad, A.R.; Wang, C.; Li, H.; Ren, J.; Dai, Y. Advances in *in vitro* production of sheep embryos. **International Journal of Veterinary Science and Medicine**, 6(Suppl): 15-26, 2018.