



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Ana Arlete de Amorim Silva

**EFEITO DA QUERCETINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE**  
**OÓCITOS DE CAPRINOS NATIVOS**

Petrolina – PE

2017

**ANA ARLETE DE AMORIM SILVA**

**EFEITO DA QUERCETINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE  
OÓCITOS DE CAPRINOS NATIVOS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior  
Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mabel Freitas Cordeiro

Petrolina – PE

2017

S586e Silva, Ana Arlete de Amorim  
Efeito da quercetina na maturação *in vitro* de oócitos de caprinos  
nativos / Ana Arlete de Amorim Silva. – Petrolina, 2017.  
87 f.:il.; 29 cm.

Dissertação (Pós-Graduação em Ciência Animal) – Universidade  
Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias,  
Petrolina, 2017.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior.

Referências.

1. Caprinos. 2. Fertilização. 3. Antioxidante. I. Título. II.  
Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 636.39082

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Ana Arlete de Amorim Silva

**EFEITO DA QUERCETINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS DE  
CAPRINOS NATIVOS**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre em Ciência  
Animal, pela Universidade Federal do Vale do  
São Francisco.

Aprovada em: \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

**Banca Examinadora**

---

Edilson Soares Lopes Júnior, Doutor, UNIVASF

---

Mabel Freitas Cordeiro, Doutora, UNIVASF

---

Maria Helena Tavares de Matos, Doutora, UNIVASF

Dedico a todos que já tiveram momentos de fraqueza ou de dúvidas. Não vai doer para sempre, então não deixe isso afetar o que de melhor há em você. Agarre-se na sua fé, acredite no seu milagre. Quando a gente não sabe o que fazer, a gente aprende!

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, força suprema e misericordiosa, por sempre me guiar nos seus caminhos e me dar força nos momentos de fraqueza.

Aos meus pais, Herlite Amorim e Eivaldo Moraes, por serem símbolos de honestidade, dedicação. Obrigada por todo apoio desmedido e por todo amor. Amo vocês!

A minha irmã Leiliane Amorim, por todo carinho, apoio, companheirismo e amizade! Obrigada irmã, por estar sempre na torcida por mim. Te amo!

A minha família, meu maior tesouro, meus avós, tios, tias, que sempre me apoiaram e entenderam minha distância. Obrigada, por toda torcida!

Ao meu orientador Prof. Dr. Edilson Soares Lopes Júnior, com seu exemplo de professor dedicado, sempre presente, desempenha brilhantemente sua profissão. Obrigada por cada oportunidade! Pela confiança e por não medir esforços para concretização deste projeto. Ainda que passe mil anos, a você, minha eterna gratidão!

À Professora Mabel, profissional exemplar, que esteve auxiliando em muitos momentos e etapas experimentais, pelos ensinamentos e sugestões. Pelas muitas vezes que me deste uma palavra de encorajamento e força. Tenho um carinho muito especial pela senhora.

À toda equipe do Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal, muito obrigada. Laisa, Bruna, Naiara, Luana, Matheus, Lilian, Joedson e Raphael, vocês foram essenciais nessa trajetória.

Ao Prof. Dr. Daniel Nogueira, pelas ajudas na análise estatística, pela paciência e disposição em ajudar.

À Professora Helena, por acreditar na pesquisa proposta, pelas sugestões e esclarecimentos, bem como, por possibilitar as análises de fluorescência, que só acrescentaram qualidade ao presente trabalho.

À Alane, pela ajuda na microscopia de fluorescência das células, pois enriqueceram o presente projeto.

A Ricássio e à Bruna Bortoloni, pois suas ajudas foram essenciais para a realização deste trabalho. Não mediram esforços para me ajudar. Muito obrigado por sanarem minhas dúvidas, por todo apoio e auxílio nas avaliações finais deste experimento.

Aos funcionários do CCA/UNIVASF (Alessandra, Augusto, Zé Arlindo, Reginaldo, Vanvan, Maelcio, Deni, Antônio, João, Maelcio, Fernanda e Peixoto), por toda ajuda e apoio que me deram durante a execução dos projetos que participei como principal responsável.

Ao corpo docente do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal (CPGCA) / UNIVASF, por contribuir para minha formação profissional, bem como à Assistente Administrativa Rosinha, pela disponibilidade e carinho com os discentes.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento desse projeto.

Muito obrigada!

*“Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza e Nele confiarei...  
Porque aos seus anjos dará ordem a teu respeito, para te guardarem  
em todos os teus caminhos...”  
(Salmo 91:1,11)*



## RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da quercetina como antioxidante alternativo à cisteamina na maturação *in vitro*. Ovários caprinos foram transportados do matadouro local para laboratório em solução salina a 0,9%, a 30°C, até três horas após o abate. Após a colheita, os oócitos foram avaliados e divididos em três grupos: Grupo CIS, onde os oócitos foram imersos em meio MIV base: TCM-199, suplementado com EGF (10 µg/mL), FSH/LH (10 µL/mL), soro de ovelha em estro (100 µL/mL) e cisteamina (10 µL/mL); nos Grupos Q4 ou Q8, os oócitos foram imersos em meio base isento de cisteamina, suplementado com 4 µM ou 8 µM de quercetina, respectivamente. A MIV dos oócitos foi realizada a 38,5°C em atmosfera umidificada de 5% de CO<sub>2</sub> em ar, durante 24 horas. Os grupos CIS e Q4 apresentaram a mesma porcentagem de células cumulus expandidas, mas o grupo Q8 foi significativamente menor que os demais grupos (P<0,05). A taxa de retração de oócitos no grupo Q8 foi maior (P<0,05) do que os tratamentos adicionais. Em relação à expansão das células do cumulus, o tratamento com 8 µM de quercetina apresentou menor proporção de oócitos expandidos com grau 1 (Total) do que os tratamentos adicionais (P<0,05). A porcentagem de oócitos MII foi maior no grupo Q4 do que no grupo CIS (P<0,05), mas os grupos CIS e Q8 foram semelhantes. A taxa de apoptose foi maior no grupo CIS do que nos grupos adicionais (P<0,05). Os oócitos dos grupos CIS e Q4 apresentaram os mesmos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e glutatona (GSH). Além disso, os oócitos maturados com 4 µM de quercetina apresentaram maior atividade mitocondrial do que os oócitos maturados nos grupos CIS e Q8 (P<0,05). Em conclusão, 4 µM de quercetina pode ser utilizada como alternativa à cisteamina na maturação *in vitro* de oócitos de caprinos, pois, a mesma resultou em taxas de maturação oocitária de caprinos maiores que àquelas obtidas com cisteamina, mantendo constantes os níveis de expansão das células do cumulus, glutatona, ERO, além, de elevar a atividade mitocondrial. Contudo, a concentração de 8 µM, levou à redução dos níveis de ERO, GSH e atividade mitocondrial oocitária, demonstrando menor viabilidade celular.

**Palavras-chave:** Antioxidante. Flavonoide. GSH. Mitocôndria. Ovário.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the effect of quercetin as an alternative antioxidant to cysteamine during in vitro maturation. Ovary goats were transported from the local slaughterhouse to the laboratory in 0.9% saline at 30 ° C until three hours after slaughter. After collection, the oocytes were evaluated and divided into three groups: CIS Group, where the oocytes were immersed in MIV medium: TCM-199, supplemented with EGF (10 µg / mL), FSH / LH (10 µL / mL), Estrus sheep serum (100 µL / mL) and cysteamine (10 µL / mL); In Groups Q4 or Q8, oocytes were immersed in cysteamine-free base medium, supplemented with 4 µM or 8 µM quercetin, respectively. The IVM of the oocytes was performed at 38.5 ° C in humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air for 24 hours. The CIS and Q4 groups presented the same percentage of expanded cumulus cells, but the Q8 group was significantly lower than the other groups (P <0.05). The oocyte retraction rate in the Q8 group was higher (P <0.05) than the additional treatments. In relation to the expansion of cumulus cells, treatment with 8 µM quercetin presented a lower proportion of expanded oocytes with grade 1 (Total) than the additional treatments (P <0.05). The percentage of MII oocytes was higher in the Q4 group than in the CIS group (P <0.05), but the CIS and Q8 groups were similar. The rate of apoptosis was higher in the CIS group than in the additional groups (P <0.05). Oocytes from the CIS and Q4 groups showed the same levels of reactive oxygen species (ROS) and glutathione (GSH). In addition, oocytes matured with 4 µM quercetin showed higher mitochondrial activity than mature oocytes in the CIS and Q8 groups (P <0.05). In conclusion, 4 µM of quercetin can be used as an alternative to cysteamine in the in vitro maturation of goat oocytes, as it resulted in rates of oocyte maturation of goats larger than those obtained with cysteamine, maintaining constant levels of cell expansion Of the cumulus, glutathione, ERO, in addition to elevating mitochondrial activity. However, the concentration of 8 µM led to the reduction of ROS levels, GSH and oocyte mitochondrial activity, demonstrating lower cell viability.

**Keywords:** Antioxidant. Flavonoid. GSH. Mitochondria. Ovary.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Representação esquemática das etapas do processo de ativação e desenvolvimento folicular (Fonte: Adaptado de Rossetto et al., (2011).....	21
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática da distribuição das organelas durante a maturação, fecundação oocitária, bem como a formação do zigoto. A) progressão da maturação nuclear e movimento das organelas do estágio de vesícula germinativa (VG) até MII e formação do zigoto. B) Distribuição de organelas e mecanismo de liberação dos grânulos corticais ( $Ca^{2+}$ ) após a entrada do espermatozoide no oócito durante a fecundação (Fonte: Adaptado de Ferreira et al., 2009).....	26
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática das principais vias moleculares que levam à apoptose (Fonte: Adaptado de Favaloro et al., 2012).....	29
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática da ação da quercetina estabilizando os radicais superóxido ( $O_2^-$ ) ou radical hidroxil ( $OH\bullet$ ) (Fonte: Adaptado de Silva, 2016).....	32
<b>Figura 5.</b> Esquematização da função da quercetina como quelante do íon férrico ( $Fe^{2+}$ ) (Fonte: Adaptado de Silva, 2016).....	33
<b>Figura 6.</b> Diferentes fases nucleares de oócitos ovinos corados com Hoechst 33258, após a maturação <i>in vitro</i> . (A) vesícula germinativa (VG); (B) ruptura da vesícula germinativa (GVBD); metáfase II (MII) com o primeiro corpúsculo polar (1 PB) (Fonte: Adaptado de Rajabi et al., 2013).....	34
<b>Figura 7.</b> Imagens fluorescentes para H2DCFDA (A), CellTracker <sup>®</sup> Blue (B) e Mitotracker <sup>®</sup> Red (C) (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017). Barra de escala: 75 $\mu$ m....	36

<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia de epifluorescência de oócito caprino de folículo pré-antral, apresentando fragmentação do DNA, após ser submetido à técnica de TUNEL (Fonte: Adaptado de Gouveia et al., 2016).....	36
<b>Figura 9.</b> Ovários em banho-maria a 30°C (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).....	40
<b>Figura 10.</b> Punção dos ovários com bomba a vácuo (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).....	40
<b>Figura 11.</b> Avaliação de oócitos (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).....	41
<b>Figura 12.</b> Oócitos caprinos expandidos, maturados <i>in vitro</i> , no grupo controle (Grupo CIS; A) ou em meio contendo 4 µM (Grupo Q4; B) ou 8 µM (Grupo Q8; C) de quercetina (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017). Aumento de 70 X.....	45
<b>Figura 13.</b> Configuração da cromatina após IVM, mostrando oócitos em vesícula germinativa após tratamento com Q8 (A); quebra da vesícula germinativa após tratamento com Q4 (B); MI após tratamento com CIS (C) e MII após tratamento com Q4 (D). Ausência de marcação do TUNEL no controle negativo (E); fragmentação de DNA no controle positivo da reação (F) e no tratamento CIS (G); ausência de marcação no tratamento Q4 (H). Seta branca indica cromatina marcada com Hoestch. Setas vermelhas indicam cromatina marcada com TUNEL. (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017). Barra de escala: 75 µm..	47
<b>Figura 14.</b> (1) Níveis intracelulares ERO, GSH e atividade mitocondrial (pixel / oócito), maturados no grupo controle (CIS) ou em meio contendo 4 µM (Q4) ou 8 µM (Q8) de quercetina. As letras diferentes entre colunas, dentro de cada parâmetro, indicam diferença significativa (P<0,05). (2) Fotomicrografia de epifluorescência de oócitos caprinos corados com diclorodihidrofluoresceína (A, B, C), Cell Tracker azul (D, E, F) e MitoTracker Red (G, H, I), detectando os níveis intracelulares ERO, GSH e atividade mitocondrial (pixel / oócito), respectivamente, maturados no grupo controle (A, D, G) ou em meio contendo 4 µM (B, E, H) ou 8 µM (C, F, I) de quercetina. (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017). Barra de escala: 75 µm.....	48

## LISTA DE TABELAS

Página

<b>Tabela 1</b> – Classificação oocitária, quanto o seu grau de qualidade (Fonte: Adaptado de Avelar et al., 2012).....	23
<b>Tabela 2</b> – Taxa de expansão de células do cumulus e retração oocitária (%) em complexos cumulus oócitos (CCOs) caprinos, maturados <i>in vitro</i> , no grupo controle (Grupo CIS) ou em meio contendo 4 µM (Grupo Q4) ou 8 µM (Grupo Q8) de quercetina (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).....	45
<b>Tabela 3</b> – Efeito da inclusão de quercetina sobre o grau de expansão das células do cumulus de oócitos caprinos, maturados <i>in vitro</i> , no grupo controle (Grupo CIS) ou em meio contendo 4 µM (Grupo Q4) ou 8 µM (Grupo Q8) de quercetina (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).....	46
<b>Tabela 4</b> – Taxa de maturação nuclear de oócitos caprinos, maturados <i>in vitro</i> , no grupo controle (Grupo CIS) ou em meio contendo 4 µM ou 8 µM de quercetina (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma(s)
$\mu\text{m}$	Micrômetro(s)
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{L}$	Microlitro(s)
VG	Vesícula Germinativa
$\mu\text{g}$	Micrograma(s)
AMPc	Adenosine Monophosphate Cyclic (Adenosina Monofosfato Cíclico)
BSA	Bovine Serum Albumin (Albumina Sérica Bovina)
CCO	Complexos Cumulus-Oócito
CGP	Células Germinativas Primordiais
CIV	Cultivo <i>In Vitro</i> de embriões
CP	Corpúsculo Polar
DNA	Deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucléico)
DM-Hepes	Defined Medium-Hepes (Meio Definido - Hepes)
eCG	Equine Chorionic Gonadotrophin (Gonadotrofina Coriônica Equina)
EGF	Epidermal Growth Factor (Fator de Crescimento Epidermal)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
ESS	Estrus Sheep Serum (Soro de Ovelha em Estro)
FCS	Fetal Calf Serum (Soro Fetal Bovino)
FSH	Follicle Stimulating Hormone (Hormônio Folículo Estimulante)

GSH	Glutathione (Glutathiona)
GVBD	Germinal Vesicle Breakdown (Quebra da Vesícula Germinativa)
IGF	Insulin like Growth Factor (Fator de Crescimento semelhante à Insulina)
LH	Luteinizing Hormone (Hormônio Luteinizante)
MEM	Minimum Essential Medium (Meio Essencial Mínimo)
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
mL	Mililitros(s)
MIV	Maturação <i>In Vitro</i>
OFF	Ovine Follicular Fluid (Fluido Folicular Ovino)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIV	Produção <i>In Vitro</i> de Embriões
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucléico)
SCE	Soro de Cabra em Estro
SOD	Superoxide dismutase (Superóxido Dismutase)
SOF	Synthetic Oviduct Fluid (Fluido Sintético de Oviduto)
TALP	Tyrode-Albumin-Lactate-Pyruvate (Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato)
TCM-199	Tissue Culture Medium 199 (Meio de Cultivo Tecidual 199)
TUNEL	Terminal deoxynucleotidil transferase-mediated dUTP nick end labeling
VG	Vesícula Germinativa

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\text{Ca}^{2+}$	Íon Cálcio
CMF2HC	4-clorometil-6,8-difluoro-7-hidroxicumarina
$\text{CO}_2$	Dióxido de Carbono
$\text{E}_2$	17 $\beta$ -estradiol
$\text{Fe}^{2+}$	Íons Ferro
H2DCFDA	Diacetato de Diclorodihidrofluoresceína
$\text{H}_2\text{O}_2$	Peróxido de Hidrogênio
$\text{N}_2$	Gás Nitrogênio
$\text{O}_2$	Gás Oxigênio
$\text{O}^{2-}$	Superóxido
$\text{OH}^-$	Radical hidroxil



## SUMÁRIO

	Página
I. INTRODUÇÃO.....	19
II. DESENVOLVIMENTO.....	20
1. Revisão de literatura.....	20
1.1. Oogênese e foliculogênese.....	20
1.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIV).....	21
1.2.1. Colheita de oócitos.....	22
1.2.2. Avaliação e seleção de oócitos.....	22
1.2.3. Maturação <i>in vitro</i> de oócitos (MIV).....	23
1.2.3.1. Maturação nuclear.....	25
1.2.3.2. Maturação citoplasmática.....	27
1.2.3.2.1. Atividade mitocondrial.....	27
1.2.3.3. Uso de antioxidantes na maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	29
1.2.3.3.1. Quercetina.....	31
1.2.3.4. Avaliação da maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	34
2. Justificativa.....	37
3. Objetivos.....	38
3.1. Objetivo geral.....	38
3.2. Objetivos específicos.....	38
4. Material e métodos.....	39
4.1. Aspectos éticos.....	39
4.2. Meios e reagentes.....	39
4.3. Local de execução.....	39
4.4. Recuperação e seleção de oócitos.....	39
4.5. Maturação <i>in vitro</i> de oócitos (MIV).....	41
4.6. Avaliação da MIV.....	41
4.6.1. Avaliação morfológica.....	41
4.6.2. Avaliação de configuração de cromatina e fragmentação de DNA oocitário.....	42
4.6.3. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo (níveis intracelulares de ERO e GSH) e mitocôndrias metabolicamente ativas.....	43

4.7. Parâmetros avaliados.....	43
4.8. Análise estatística.....	44
5. Resultados.....	45
6. Discussão.....	49
III. CONCLUSÕES.....	52
IV. REFERÊNCIAS.....	53
V. ANEXOS.....	67

## I. INTRODUÇÃO

As taxas de maturação oocitária em condições *in vitro* são inferiores quando comparadas às aquelas *in vivo*. Um possível fator que justifica essa realidade é a produção exacerbada de espécies reativas de oxigênio (ERO) durante a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos (SILVA et al., 2010), o que pode culminar com o bloqueio ou retardo do desenvolvimento oocitário, afetando, negativamente, a viabilidade destas células (KANG et al., 2013). Em condições adequadas, o equilíbrio das concentrações de ERO têm impacto positivo na produção *in vitro* de embriões (PIV), pois culmina na promoção das competências oocitária e embrionária, a partir da geração de energia durante o metabolismo (GUEMRA et al., 2013). Nesse sentido, algumas substâncias inibidoras de ERO, ou seja, os antioxidantes, têm sido considerados importantes componentes para complementar os meios de MIV, como, por exemplo, a cisteamina (MUDO et al., 2015), cisteína (PU et al., 2014), vitamina E (SILVA, 2015), dentre outras. No entanto, apesar de apresentarem resultados satisfatórios, estas substâncias têm elevado o custo da composição dos meios. Neste sentido, faz-se necessária a otimização da MIV, através da adição de substâncias alternativas com potencial antioxidante associado a um baixo custo de aquisição.

A quercetina (3, 5, 7, 3'-4'-pentahidroxi-flavona) é um flavonoide natural, largamente encontrado em vegetais, grãos, frutas, flores, chás, possuindo propriedades terapêuticas e potencial antioxidante biológico (BEHLING et al., 2004). O efeito positivo da quercetina já foi observado na maturação oocitária em bovinos (GUEMRA et al., 2013). Além disso, a presença de quercetina resultou em excelentes taxas de maturação de oócitos suínos e posterior desenvolvimento até o estágio de blastocisto, através da redução dos níveis de ERO intracelulares (ORLOVSCHI; MICLEA; ZAHN, 2014). Somado a isso, seu custo de aquisição é 3,6 vezes mais barato, quando comparado ao antioxidante convencional cisteamina, o que favorece a redução de custos na MIV. Entretanto, na literatura, não há relatos sobre o efeito da inclusão de quercetina como antioxidante na MIV de oócitos caprinos.

## II. DESENVOLVIMENTO

### 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1. Oogênese e Foliculogênese

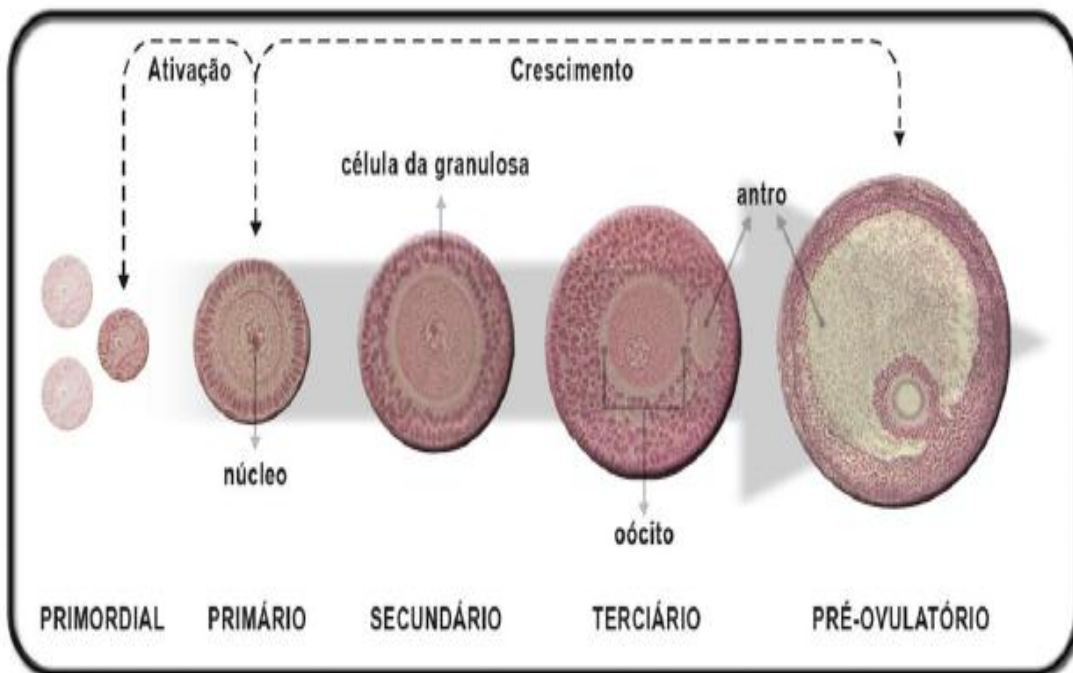
O mecanismo fisiológico de desenvolvimento oocitário (oogênese) e folicular (foliculogênese) é caracterizado como o mecanismo de formação, crescimento e maturação folicular, que iniciam com a gênese do folículo primordial, culminando com o estágio de folículo pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). É durante a fase de desenvolvimento folicular que o oócito adquire a competência para seu posterior desenvolvimento (HOSHI, 2003). Os oócitos são morfológicamente alterados, à medida que os mesmos se desenvolvem, onde as células da granulosa circundantes proliferam e se diferenciam (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). O crescimento folicular se dá continuamente ao longo da vida ou até ocorrer à redução do número de folículos primordiais. Quando um determinado folículo deixa a reserva, o mesmo se desenvolve até o processo de ovulação ou sofre atresia folicular (MAYER; DEVINE; DYER, 2004). Os folículos podem ser classificados, em primordiais, primários, secundários, terciários e pré-ovulatório (FIGUEIREDO et al., 2008) (Figura 1).

Podemos denominar como folículos primordiais, aqueles caracterizados por um oócito esférico ou oval, circundado por células da pré-granulosa de morfologia pavimentosa. Esses por sua vez, dão origem a outros folículos em processo de crescimento, a exemplo dos folículos primários, de transição, secundários e terciários, (PEPE; BILLIAR; ALBRECHT, 2006).

No tocante aos folículos primários, os mesmos, são caracterizados por um oócito circundado por células da granulosa cúbicas, dispostas em uma única camada. Nessa etapa, o oócito passa a manter um estreito contato com as células da granulosa (LUCCI; SILVA; CARVALHO, 2001), que por sua vez, sofrem intensa proliferação, resultando na formação de uma nova camada de células, culminando com a formação de um novo grupo folicular, denominado de folículos secundários. Nessa classe de folículos um oócito é circundado por duas ou mais camadas de células da granulosa de morfologia cuboide. O núcleo do oócito assume uma posição excêntrica e as organelas começam a mover-se em direção a periferia do

oócito. Por efeitos gonadotróficos e/ou de fatores de crescimento, os folículos secundários se transformam em folículos terciários, à medida que ocorre aumento do fluido antral entre as camadas de células granulosa, resultando por sua vez, no aumento do diâmetro folicular (JAGARLAMUDI; RAJKOVIC, 2012).

**Figura 1.** Representação esquemática das etapas do processo de ativação e desenvolvimento folicular. (Fonte: Adaptado de Rossetto et al., 2009).



A continuação do desenvolvimento dos folículos terciários se dá pelo crescimento, recrutamento, seleção e dominância (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Contudo, o oócito continua com o núcleo em prófase I e só retoma a meiose após o pico pré-ovulatório de LH. Posteriormente, o oócito permanece no estágio de metáfase II até o momento da fecundação (HOSHI, 2003).

## 1.2. Produção *in vitro* de embriões (PIV)

A PIV desponta como uma ferramenta promissora, uma vez que possibilita a utilização otimizada de fêmeas doadoras de oócitos, assim como o aumento da quantidade de embriões produzidos, pois, mimetiza, em condições controladas de

laboratório, o desenvolvimento embrionário (SIMPLÍCIO; FREITAS; FONSECA, 2007).

A sua eficácia depende de uma série de fatores que, por sua vez, estão ligados as suas etapas, ou seja, à maturação (MIV) e fecundação *in vitro* (FIV) de oócitos, bem como ao cultivo *in vitro* (CIV) de embriões (GONÇALVES et al., 2008), principalmente pela qualidade do oócito recuperado, uma vez que, este parâmetro é considerado o fator chave que influencia a PIV (KATSKA-KSIAZKIEWICZ; OPIELA; RYNSKA, 2007).

### **1.2.1. Colheita de oócitos**

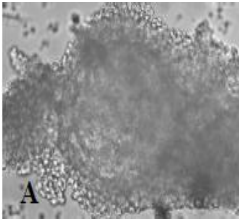
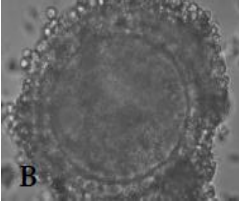
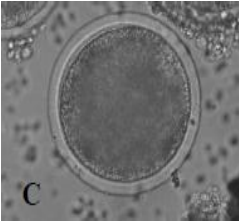
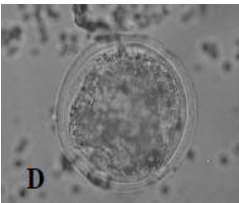
A obtenção dos oócitos é uma etapa básica para realização da biotécnica de PIV, podendo ser realizada sob condições *in vitro* ou *in vivo*. As colheitas *in vitro* de oócitos podem ser realizadas por punção/aspiração ou por fatiamento (“slicing”) folicular a partir de ovários obtidos de abatedouros. Já aquelas *in vivo* têm sido executadas por aspiração de folículos, utilizando-se métodos de laparotomia, laparoscopia (AVELAR et al., 2012; SILVA, 2015).

### **1.2.2. Avaliação e seleção de oócitos**

Logo após a recuperação, os oócitos são classificados de acordo com sua morfologia a fim de estimar seu potencial de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário. Sua qualidade é estimada pela mensuração da quantidade de células do *cumulus oophorus* e aspecto do ooplasma (Tabela 1). Durante o processo de obtenção dos CCOs, a remoção das células do *cumulus* torna os oócitos menos competentes, uma vez que, em condições *in vivo*, estas células favorecem um melhor ambiente intra-folicular para seu desenvolvimento (COGNIÉ et al., 2004). Isso porque a presença das células do cumulus, bem como sua íntima associação com oócito por meio das junções “GAP” comunicantes, auxiliam os oócitos a tolerar melhor os eventos da MIV, assim como o desenvolvimento embrionário (SHIMADA; TERADA, 2002). Através da transferência de nutrientes, essas células asseguram sua nutrição e conexão do oócito com o meio externo (TANGHE et al., 2002). Além disso, as células do cumulus utilizam antioxidantes endógenos como a cistina do meio extracelular convertendo-a em

cisteína, além de sintetizar glutathiona (GSH), ambas as substâncias protegem os oócitos de possíveis danos oxidativos, processo este considerado crucial para a eficiente produção *in vitro* de embriões (WANI et al., 2000).

**Tabela 1** – Classificação oocitária, quanto ao grau de qualidade (Fonte: Adaptado de Avelar et al., 2012).

Classificação	Imagem	Características
Grau I		Várias camadas de células do <i>cumulus</i> compactas, citoplasma granuloso e homogêneo em toda ZP.
Grau II		Três camadas de células do <i>cumulus</i> e citoplasma finamente granuloso.
Grau III		Revestimento celular incompleto ou ausente ou citoplasma oocitário heterogêneo.
Grau IV		Morfologia anormal, citoplasma oocitário (heterogêneo/apoptótico) e revestimento gelatinoso.

### 1.2.3. Maturação *in vitro* de oócitos (MIV)

A maturação *in vitro* dos oócitos representa uma das etapas mais desafiadoras da PIV, uma vez que a tradução dos genes durante este período irá determinar a eficiência das modificações nucleares, citoplasmáticas e moleculares, estando estas, por sua vez, ligadas a uma série de mudanças estruturais e bioquímicas que tornam o oócito apto a ser fecundado (HARTWIG et al., 2014).

Em condições *in vivo*, a maturação tem início logo após o pico pré-ovulatório de LH. É durante a fase de desenvolvimento folicular que o oócito adquire a competência para seu posterior desenvolvimento (HOSHI, 2003). Já em condições *in vitro*, este processo se inicia com a remoção do oócito do interior do folículo ovariano.

A maturação oocitária inadequada, seja no núcleo ou no citoplasma, compromete o processo de fecundação e desenvolvimento embrionário (LONERGAN et al., 2003).

Vários meios comerciais têm sido usados como base para os sistemas de MIV, tais como: TCM199, NCSU23 e Meio Essencial Mínimo (MEM) (SUTTON; GILCHRIST; THOMPSON, 2010). Dentre estes, vem ganhando destaque o meio comercial TCM-199.

O TCM199, é meio comercial padrão amplamente usado na maturação *in vitro* de oócitos em varias espécies (WATSON et al., 2000; GANDHI et al., 2000; SILVA, 2015), sendo um meio considerado bastante rico (WATSON et al., 2000). Marques et al. (2007) encontraram excelentes resultados na taxa de MIV de oócitos suínos em TCM 199, quando comparados àqueles obtidos com NCSU23 como meio de maturação. Entretanto, os meios-base podem apresentar necessidade de suplementação energética e/ou proteicas, bem como, ajustes na osmolaridade e pH (GANDHI et al., 2000).

A suplementação de diferentes substâncias aos meios de maturação é uma prática rotineira nos laboratórios de PIV. Dentre as substâncias mais empregadas, ganham destaque: piruvato de sódio, soro fetal bovino (SFB), soro de fêmea em estro, hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), estradiol (E<sub>2</sub>), fatores de crescimento, cisteamina e glutamina (BERNADI, 2005).

A adição de fontes proteicas tem sido amplamente realizada, a exemplo da inclusão de SFB (MINGOTI, 2005). Seu efeito benéfico está relacionado à presença de outras substâncias como hormônios, vitaminas, fatores de crescimento, lipídios e proteínas que auxiliam na maturação nuclear e citoplasmática oocitária (SHIRAZI et al., 2007). Outra fonte proteica bastante utilizada na MIV é a albumina sérica bovina (BSA), a qual auxilia no equilíbrio da osmolaridade, além de remover as espécies reativas de oxigênio (ERO) (GUÉRIN; MOUATASSIM; MENEZO, 2001).

Os oócitos imaturos que são extraídos dos folículos possuem baixa capacidade de desenvolvimento. Dessa forma, faz-se necessária a adição de gonadotrofinas e



esteroides aos meios de maturação (COELHO et al., 2002). É sabido que as gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) atuam na indução da maturação nuclear (SILVA, 2015), na expansão das células da granulosa (CHOI et al., 2013), melhorando, assim, a qualidade embrionária (GALLI; CROTTI; NOTARI, 2001).

O estradiol ( $E_2$ ) é outro componente utilmente adicionado em alguns protocolos, embora seus efeitos na MIV ainda não sejam bem explicados (COGNIÉ et al., 2004).

Facultativamente, são adicionados aos meios MIV, fatores de crescimento, como o fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e o fator de crescimento epidermal (EGF) (COGNIÉ et al., 2004). O EGF possui como principal efeito o estímulo da síntese de glutatona intracelular oocitária e, conseqüentemente, resulta na proteção ao DNA, melhorando a síntese de proteínas e aminoácidos, regulando a maturação através do estímulo para a quebra da vesícula germinativa e expansão das células do cumulus (WHITAKER; KNIGHT, 2004).

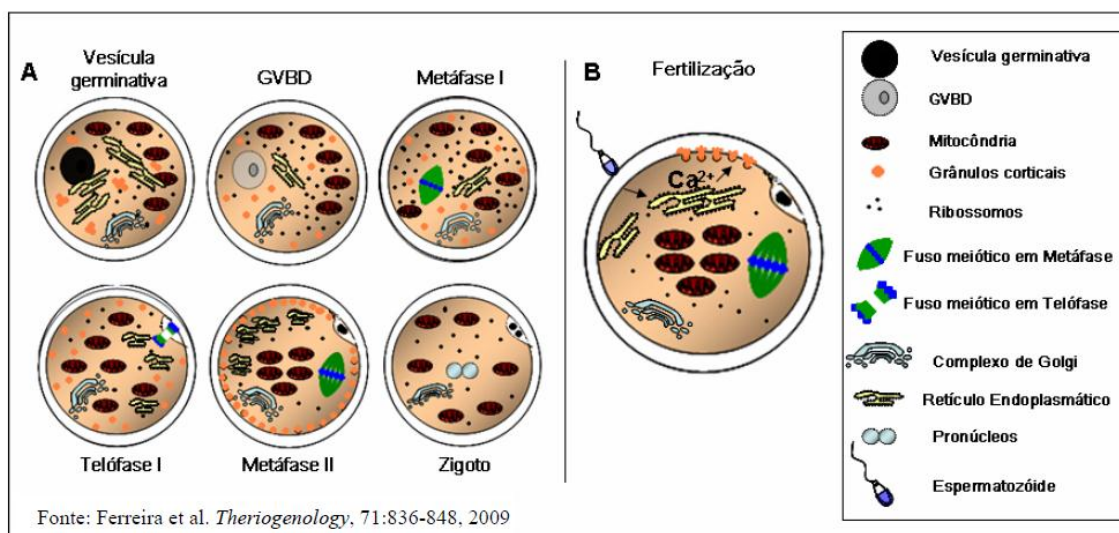
Além da constituição dos meios de MIV, outros fatores colaboram para a eficiência da MIV, tais como o controle da tensão de gás carbônico e oxigênio, temperatura, umidade e tempo de maturação (TRALDI, 2009).

#### **1.2.3.1. Maturação nuclear**

Na maturação nuclear *in vivo*, a competência meiótica inicia-se em concomitância com o pico de LH, uma vez que, o aumento dos níveis de LH resulta na queda dos níveis de AMPc (adenosina monofosfato cíclico), a partir da dissociação das junções *gap* entre oócitos e células da granulosa e da redução da síntese do próprio AMPc por estas células (KAWAMURA et al. 2004). Conseqüentemente, ocorre desfosforilação e ativação do fator promotor da maturação (MPF), que passa a desencadear vários eventos nucleares e citoplasmáticos relacionados à maturação oocitária. A ação do LH é mediada pelo fator de crescimento epidermal (EGF), produzido pelas células da granulosa (GUIMARÃES, 2013). Em condições *in vitro*, o restabelecimento da meiose se dá após a remoção do oócito de dentro do ambiente folicular, resultante da perda de contato entre o oócito e as células intrafoliculares (HOSHI, 2003). Esse processo compreende os estádios entre a prófase I e a metáfase II, abrangendo alguns fenômenos tais como condensação de cromossomos e a desintegração do envelope

nuclear (GVBD), marcando o início da maturação nuclear (GILCHRIST; THOMPSON, 2007). Estas etapas são moduladas por fatores presentes no fluido folicular, a partir de interação dos oócitos com as células intrafoliculares e por fatores endócrinos, como as gonadotrofinas (KIM; LEE; PARK, 2011). Essa primeira divisão da meiose resulta na divisão assimétrica do citoplasma, gerando duas células de tamanhos distintos: uma pequena, denominada de corpúsculo polar; e outra maior, chamada de oócito secundário (CAN; SEMIZ; CINAR, 2003). A maturação nuclear ocorre entre 16 e 24 h após o início da MIV (COGNIÉ et al., 2004) (Figura 2). Após a maturação nuclear, o oócito permanece nesse estágio do ciclo celular (M II) até a fecundação (MAYES; SIRARD, 2002).

**Figura 2.** Representação esquemática da distribuição das organelas durante a maturação, fecundação oocitária, bem como a formação do zigoto. A) Progressão da maturação nuclear e movimento das organelas do estágio de vesícula germinativa (VG) até MII e formação do zigoto. B) (Fonte: Adaptado de Ferreira et al., 2009).



Além de modificações nucleares e citoplasmáticas, os oócitos sofrem alterações nas células do *cumulus oophorus*. A expansão das células do *cumulus* consiste em modificações que vão desde a diferenciação celular, deixando de ser uma massa compacta, tornando-se uma estrutura dispersa, até a síntese da matriz intercelular mucoide. Tal processo é de suma importância para assegurar a maturação oocitária (YOKO; SATO, 2004). Durante a expansão do *cumulus*, o ácido hialurônico mediado por receptores oocitários específicos induz a ativação de fatores

promotores da maturação (*maturation promoting factors* - MPFs), resultando no rompimento da vesícula germinativa (JAIN et al. 2012).

### **1.2.3.2. Maturação citoplasmática**

A etapa de maturação citoplasmática pode ser considerada como o conjunto de processos pelo qual o oócito passa para tornar-se uma célula capaz de ser fecundada e dar suporte ao desenvolvimento embrionário inicial (LIU; HOU; YAO, 2010). Estas mudanças incluem a redistribuição das organelas celulares, dentre elas os grânulos corticais, síntese e estocagem de proteínas e RNA, maturação dos mecanismos regulatórios de  $Ca^{2+}$ , aumento da glutatona intracitoplasmática e atividade mitocondrial (ANEL et al., 2007).

#### **1.2.3.2.1. Atividade mitocondrial**

Com relação à atividade mitocondrial, as mitocôndrias são organelas que instituem a “fábrica bioenergética” da célula, por meio da geração de ATP, a partir fosforilação oxidativa via lactato e piruvato. Essas organelas auxiliam a competência funcional dos oócitos durante a fase de maturação nuclear ou citoplasmática (MOUSSA et al., 2015). O desequilíbrio do sistema oxido-redução provoca danos irreparáveis a essas organelas, culminando na sua disfunção (TANABE et al., 2015).

A avaliação do metabolismo mitocondrial é uma ferramenta promissora, uma vez que, mensura as atividades dessa importante organela, como a geração de trifosfato de adenosina, homeostase do cálcio, sinalização celular, regulação do estado redox citoplasmático e, conseqüente, equilíbrio da produção de ERO. Nesse sentido, estudos mostraram que a injeção intracitoplasmática de mitocôndrias pode ser uma excelente alternativa para melhorar a qualidade oocitária (MORRIS et al., 2006).

A atividade mitocondrial em oócitos é considerada um excelente marcador de qualidade e viabilidade. Estudos recentes mostram que esta atividade pode estar relacionada à competência intrínseca do oócito uma vez que o potencial de membrana mitocondrial em oócitos imaturos é menor do que o observado em oócitos maduros (TARAZONA et al., 2006).

À medida que o oócito envelhece, ocorre redução na sua capacidade de reduzir o estresse oxidativo (SILVA, 2015), o que contribui como uma das causas de baixas taxas embrionárias em condições *in vitro*, em virtude da ocorrência de apoptose celular (MEHAISEN et al., 2015).

O processo fisiológico de apoptose ocorre tanto no desenvolvimento oocitário e embrionário-fetal como no decorrer da vida adulta (BARRETO, 2007). Esse fenômeno é caracterizado pela morte celular programada, controlado em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos (ZIMMERMANN; BONZON; GREEN, 2001), e está entre os fatores que influenciam a competência oocitária (ZARAZA et al., 2010). Esse processo é controlado por proteínas intracelulares (GOUGEON, 2010), que promovem alterações bioquímicas e morfológicas, tais como, extravasamento de conteúdo citoplasmático, fragmentação de cromatina e DNA, com consequente formação de corpos apoptóticos (RACHID et al., 2000). A correção ineficiente de danos ao DNA resulta em mutação, ou na eliminação celular por autofagia, mitose anormal e apoptose, processos estes que envolvem complexas reações enzimáticas (ROOS; KAINA, 2006).

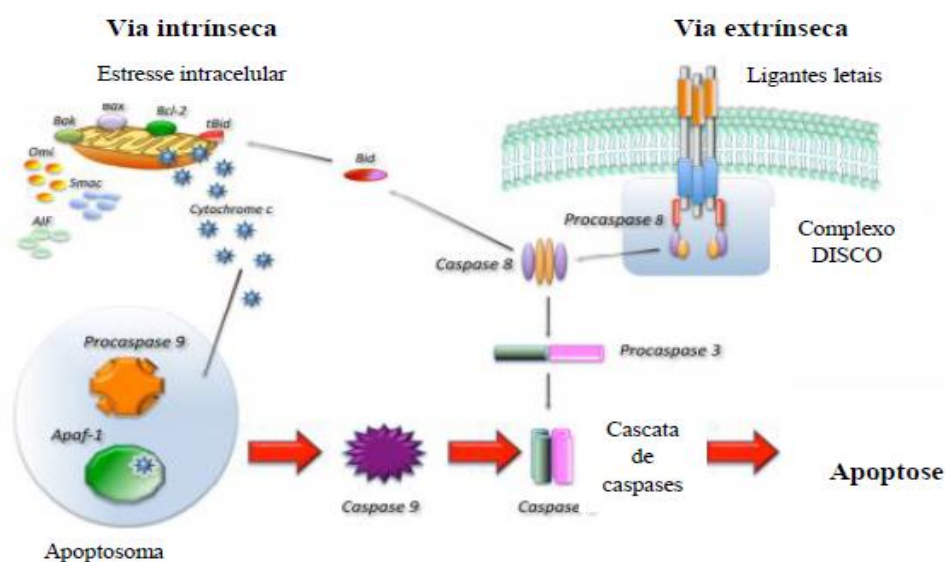
A apoptose é iniciada por sinais intracelulares e extracelulares por duas vias: receptores de morte de membrana (extrínseca) e a via mitocondrial (intrínseca). No tocante, a via extrínseca, a mesma é mediada por “receptores de morte” através da membrana celular, especialmente: receptor TNF (TNFR1) e TNF–ligante relacionado com indução de apoptose (TRAIL-R1). Tais receptores, uma vez ligados aos ligantes específicos TNF- $\alpha$ , Fas-L e TRAIL, sinalizam a formação de um complexo indutor de morte a partir do recrutamento da caspase-8 e, posteriormente, ativação das caspases efetoras (caspase-3), (CIRCU; AW, 2010), responsáveis pela quebra das ligações peptídicas de aminoácidos e proteínas essenciais, culminando na morte celular (HUTT, 2015).

A segunda via da apoptose (via mitocondrial ou via intrínseca), é caracterizada pela produção de sinais emitidos no interior da célula (HUSSEIN, 2005), resultando na liberação de proteínas pró-apoptóticas para o citoplasma, como: citocromo C, AIF (Apoptosis inducing factor) e Smac/Diablo (Second mitochondrial activator of caspase/IAP-Binding Protein Directly with low PI) (GREEN; KROEMER, 2004; YIVGI-OHANA et al., 2011). Tal mecanismo resulta na dissipação do potencial da membrana mitocondrial e, consequente, redução de ATP, assim como liberação de uma série de proteínas que contribuem para a ativação da caspase, a exemplo do

Fator Indutor da Apoptose (AIF) e a endonuclease G (endo G), que induz a formação de apoptossomo. No apoptossomo, a caspase-9 é ativada que, posteriormente quebra as ligações peptídicas, resultando por sua vez na ativação de moléculas, como a caspase-3, desencadeando a apoptose (FAVALORO et al., 2012) (Figura 3).

Nesse cenário, a adição de antioxidantes ao meio de maturação tem sido uma importante alternativa frente ao resgate da função mitocondrial e, por conseguinte, produção de ATP (LANE; GARDNER, 2012), a fim de assegurar desenvolvimento embrionário (SILVA, 2015).

**Figura 3.** Representação esquemática das principais vias moleculares que levam à apoptose (Fonte: Adaptado de Favaloro et al., 2012).



### 1.2.3.3. Uso de antioxidantes na maturação *in vitro* (MIV)

Durante a PIV, um fator que interfere no processo de maturação oocitária é o estresse oxidativo, resultante da produção exacerbada de ERO, principalmente dos compostos: superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e hidroxila ( $OH^-$ ), decorrente, por sua vez, da tensão de oxigênio, exposição à luz e excesso de manipulação (SILVA et al., 2010), causando por sua vez, efeitos deletérios nas mitocôndrias, tais como: ativação das proteases e caspases, culminando na condensação e fragmentação da cromatina, apoptose, alteração da divisão celular e do desenvolvimento embrionário (VELEZ-PARDO et al., 2007), bloqueio ou retardo

do desenvolvimento do oócito ou embrião, afetando, negativamente, a viabilidade destas células (ZHANG et al., 2015). Nesse sentido, aos meios *in vitros* vêm sendo adicionados substâncias antioxidantes.

Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e redução das lesões causadas pelo estresse oxidativo, resultante de vários processos de metabolismo normal das células (BIANCHI; ANTUNES, 1999), evitando a destruição da membrana plasmática com a formação do peróxido, quando o mesmo reage com oxigênio (SALES, 2005). Essas substâncias são divididas em duas classes distintas: antioxidantes endógenos ou enzimáticos e exógenos ou não enzimáticos.

No tocante aos antioxidantes endógenos ou enzimáticos, as substâncias mais conhecidas são a superóxido dismutase (SOD), catalase e glutatona (GSH).

De modo especial, a GSH está em maior concentração no oócito quando comparada as outras enzimas supracitadas. Sua síntese é regulada por gonadotrofinas e sua concentração tende a aumentar no decorrer do processo de maturação, principalmente em oócitos no estágio de metáfase II. Essa enzima pode ser considerada um importante marcador bioquímico a fim de estimar a viabilidade e maturação oocitária (ZUELKE et al., 2003).

Em oócitos maturados *in vitro*, a concentração intracelular de GSH é reduzida quando comparada à maturação *in vivo*. Isto se deve ao desequilíbrio na produção de ERO no sistema de maturação (LIVINGSTON et al., 2004), possivelmente, porque dentro do líquido folicular e no oviduto há uma considerada concentração de antioxidantes endógenos e, à medida que o oócito é puncionado, este é submetido a uma condição fisiológica de estresse oxidativo, o que resulta, por sua vez, em alterações mitocondriais, bloqueio da meiose oocitária e apoptose (AGARWAL; PRABAKARAN; SAID, 2005).

Nem sempre o sistema enzimático é eficiente frente a uma grande quantidade de EROs. Nesse sentido, quem ganha destaque é o sistema não enzimático ou exógeno, onde um grande número de substâncias de baixo peso molecular vem sendo amplamente utilizado (TAKAHASHI, 2012).

A adição de antioxidantes exógenos, como o cobre, selênio, zinco, magnésio, ácido ascórbico (vitamina C) e  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), e aminoácidos, como a cisteína (YAMAUCHI; NAGAI, 1999) e cisteína (ALI et al., 2013), podem eliminar ou equilibrar a concentração ERO (MICLEA et al., 2012).

A cisteamina é o antioxidante mais empregado nos protocolos de maturação de um laboratório de PIV, sendo considerado o aminotiol estável mais simples, resultante da degradação da cisteína (CLARK et al., 2006). A cisteína é amplamente aproveitada 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).

Após adicionar cisteamina no meio de maturação, Mudo et al. (2015) obtiveram uma taxa de 72% de oócitos caprinos maduros.

Diante do exposto, percebe-se a importância de maximizar a eficiência da MIV diante dos sistemas de cultivos atuais, de modo especial, no que se refere ao uso de antioxidantes alternativos de baixo custo de aquisição, que resultem no equilíbrio da produção de ERO. Dentre estas substâncias alternativas vem ganhando destaque os compostos fenólicos, a exemplo da quercetina, cujos resultados positivos são evidenciados na PIV (GUEMRA et al., 2013). Além disso, a quercetina é 3,6 vezes mais barata que a cisteamina, o que passa a reduzir os elevados custos nos protocolos de PIV.

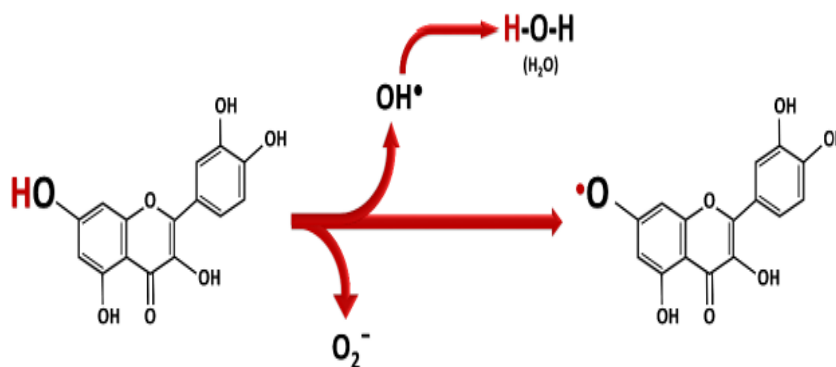
#### **1.2.3.3.1. Quercetina**

A quercetina (3, 5, 7, 3'-4'-pentahidroxi-flavona) é um flavonoide natural, encontrado em vegetais, grãos, frutas, flores, chás. É uma aglicona, que também pode ser encontrada na forma glicosilada com diferentes açúcares. Dentre os flavonoides, a quercetina se destaca por ter maior bioatividade que outros flavonoides, a exemplo da rutina. É insolúvel em éter e outros solventes apolares. Por esta razão, sua dissolução quando, em pó, é feita na presença de bases (GARGOURI et al., 2011).

É considerado um excelente agente com propriedades terapêuticas tais como, antineoplásica, antiarrítmica, antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória e antioxidante (KELLY, 2011). Além disso, possui habilidade de se ligar a substâncias tais como, transportadores de hormônios, enzimas e DNA (ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014). Sua ação antioxidante no controle ao estresse oxidativo tem sido evidenciada por vários pesquisadores (LIU; HOU; YAO, 2010; KANG et al., 2013; ZRIBI et al., 2012; JOHINKE; DE GRAAF; BATHGATE, 2014).

O mecanismo de ação da quercetina se dá em três etapas distintas: na interação com íons superóxido; na formação de radicais hidroxila (Figura 4), por quelar íons ferro (Figura 5); e na peroxidação lipídica, por reagir com radicais de peróxido de lipídios (AFANAS'EV; DOROZHKOVA; BRODSKII, 1989). Este processo é baseado na constituição primária dos flavonoides, caracterizados por 15 carbonos, presentes em dois anéis fenólicos, que são ligados à unidade do carbono 3, apresentando uma molécula de glicídio (LIN et al., 2002).

**Figura 4.** Representação esquemática da ação da quercetina estabilizando os radicais superóxido ( $O_2^-$ ) ou radical hidroxil ( $OH^\bullet$ ) (Fonte: Adaptado de Silva, 2016).

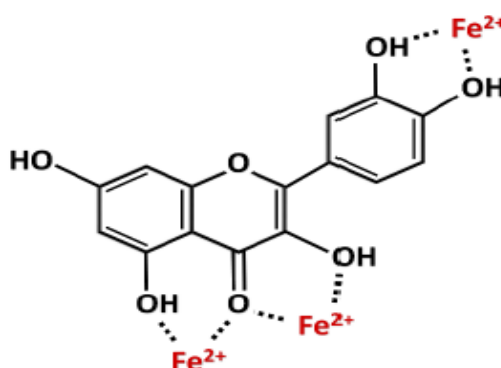


Essa substância exibe três importantes componentes estruturais que estão associados com sua ação antioxidante. Um deles é a presença do grupo catecol, responsável pela formação de radicais fenoxil estáveis após a doação de hidrogênio; Uma dupla ligação entre os carbonos que estão em conjugação como o grupo 4-carbonil, possibilitando a saída a elétron do radical fenoxil; Um grupamento 3-OH combinado com uma dupla ligação entre carbonos, culminando na estabilização dos elétrons que foram reorganizados na molécula (SILVA; GUERRA, 2012).

A quercetina apresenta potencial antioxidante de combate aos ERO, cinco vezes maior que o ácido ascórbico (vitamina C) e o tocoferol (vitamina E) (MERCK, 2000). Todavia, por ser hidrossolúvel e metabolizada facilmente, a quercetina precisa ser associada a um redutor de oxidação, a exemplo da vitamina C, a fim de continuar prolongando seu efeito antioxidante (PACE-ASCIAK et al., 1995).



**Figura 5.** Esquemática da função da quercetina como quelante do íon férrico ( $\text{Fe}^{2+}$ ) (Fonte: Adaptado de Silva, 2016).



Em humanos, a inclusão de 50  $\mu\text{M}$  de quercetina ao sêmen congelado-descongelado resultou no aumento da motilidade e redução da fragmentação de DNA (ZRIBI et al., 2012). Quando adicionada ao sêmen refrigerado de coelhos, a quercetina induziu menor dano à membrana plasmática e acrossomal, bem como baixos índices de peroxidação lipídica (JOHINKE; DE GRAAF; BATHGATE, 2014). Esses dados corroboram com os encontrados por Alrawaiq e Abdullah (2014), quando trabalhou com antioxidantes na indução de estresse oxidativo de espermatozoides de camundongos.

Na espécie bovina, sua utilização como antioxidante na maturação de oócitos e, principalmente, no desenvolvimento embrionário resultou em dados satisfatórios (GUEMRA et al., 2013). Da mesma forma, oócitos suínos, quando maturados na presença de quercetina, demonstraram excelentes taxas de desenvolvimento embrionário, principalmente no estágio de blastocisto, uma vez que a quercetina reduziu os níveis de ERO intracelulares (KANG et al., 2013).

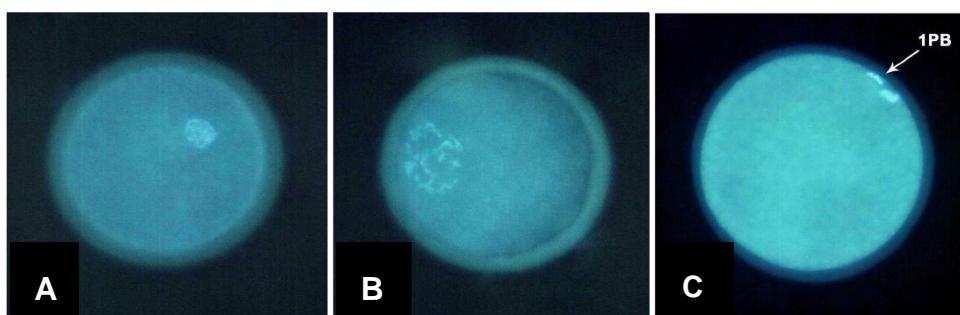
Apesar dos flavonoides apresentarem propriedades antioxidantes importantes na prevenção de doenças, alguns estudos têm demonstrado uma atividade pró-oxidante *in vitro*, que vem resultando em efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos. Isso, possivelmente, porque a capacidade antioxidante desta substância pode também acentuar o estresse oxidativo, causando danos estruturais, funcionais e moleculares às células. Diante disso, torna-se necessário a realização de mais investigações acerca do assunto, testando diferentes níveis de inclusão de quercetina a fim de encontrar uma concentração ótima deste antioxidante, que equilibre a produção de ERO.

#### 1.2.3.4. Avaliação da maturação *in vitro* (MIV)

A adoção de técnicas para a análise da qualidade oocitária durante a MIV permite o monitoramento das alterações ocorridas nas principais fases da MIV, sendo, portanto, de grande importância para a melhoria de seus sistemas. A técnica mais empregada é a análise subjetiva da morfologia da expansão das células do cumulus a partir da utilização de um estereomicroscópio (SILVA, 2015).

Além desta, outras técnicas são amplamente utilizadas nos laboratórios de PIV. Dentre elas, podemos lançar mão da microscopia de fluorescência e analisar a eficiência da MIV a partir da avaliação de configuração da cromatina de oócitos, indicando, por sua vez, o estágio meiótico alcançado após terem sido maturados *in vitro* (DUARTE et al., 2010). Para tanto, utiliza-se o corante Hoechst 33342, o qual, por sua vez, adentra as células, se intercalando entre as bases nitrogenadas do DNA, possibilitando visualizar o grau de organização da cromatina nuclear (Figura 6).

**Figura 6.** Diferentes fases nucleares de oócitos ovinos corados com Hoechst 33258 após a maturação *in vitro*: vesícula germinativa (VG); ruptura da vesícula germinativa (GVBD); metáfase II (MII) com o primeiro corpúsculo polar (1 PB) (Fonte: Adaptado de Rajabi et al., 2013).



Outras análises destinadas à eficiência da PIV são a quantificação das espécies reativas de oxigênio (ERO) e níveis intracelulares de glutathiona (GSH) (YOON et al., 2014). Para a quantificação de ERO, utiliza-se o marcador diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA), por meio do processo da oxidação de dichlorofluoresceína 2'-7' (H2DCF) à 2'-7'dichlorofluoresceína (DCF) e a formação diacetato, H2DCFDA e seu éster acetometil H2DCFDA-AM que são absorvidos pelas células, resultando em um composto carregado e altamente fluorescente, o

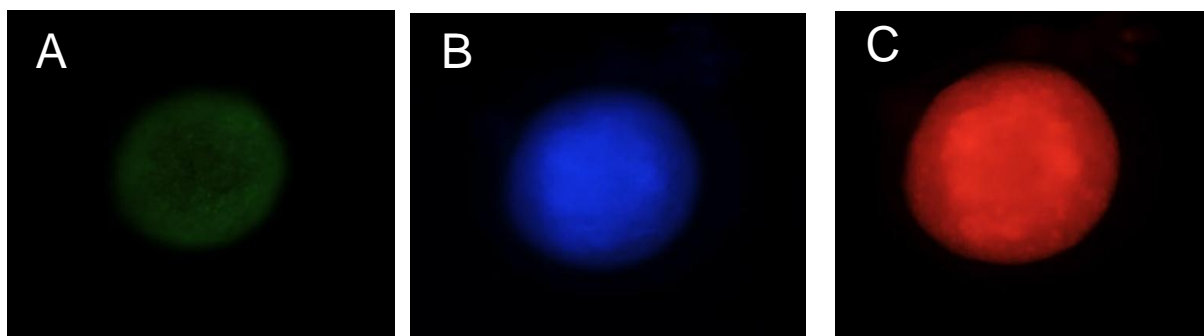
qual é retido no interior da célula. O resultado dessa reação faz com que seja observada uma fluorescência verde, de distintos níveis de intensidades, devido a diferentes quantidades da ERO na célula (YOU; HYUN; LEE, 2012).

No tocante, a quantificação de GSH, a mesma se dá a partir da incubação dos oócitos na presença do marcador 4-clorometil-6.8-difluoro-7-hidroxicumarina (CellTracker azul; CMF2HC), que passa livremente através das membranas celulares. Suas sondas de fluorescência contêm um grupo clorometilo ou bromometilo, que reage com grupos tiol, utilizando uma reação de GSH-S-transferase-mediada, resultando por sua vez, na expressão da fluorescência azul (YOU; HYUN; LEE, 2012). Os níveis intracelulares de GSH e de ERO, em concentrações ideais e em oócitos maturados, podem influenciar a formação de pronúcleos, reduzir as lesões celulares causadas pelos ERO, elevando, assim, as taxas de maturação *in vitro* (PINTO et al., 2013).

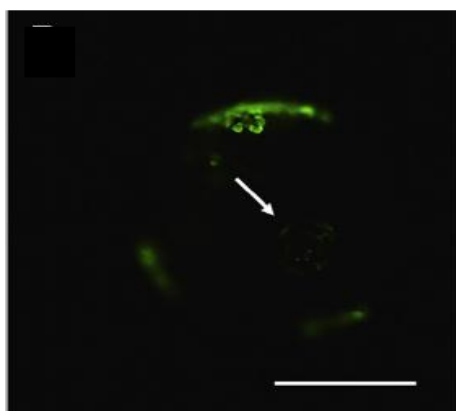
Outra importante avaliação é o metabolismo das mitocôndrias, quando se deseja estimar a qualidade e viabilidade oocitária. Vários estudos têm usado corantes fluorescentes como MitoTracker Red para determinar a correlação existente entre um bom desenvolvimento oocitário e sua atividade mitocondrial, uma vez dentro da célula, esse marcador é transformados em produtos impermeabilizantes. O MitoTracker Red atravessa a membrana celular e se acumula nas mitocôndrias com potencial de membrana ativa, resultando na emissão de fluorescência nas tonalidades: vermelha ou laranja (VAN BLERKOM; DAVIS; ALEXANDER, 2003) (Figura 7).

Para muitos autores, outra técnica que possibilita avaliar a qualidade oocitária e embrionária é a análise de fragmentação de DNA, uma vez que, esse processo está associado com a redução da viabilidade da célula (BYRNE et al., 1999). A forma mais usada na quantificação de fragmentação de DNA, é a reação de TUNEL a partir da identificação de fragmentação internucleossômica do DNA. Nessa reação, o grupo 3'-OH do DNA fragmentado é marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC) pela enzima deoxinucleotídeo transferase (Tdt), que, por sua vez, catalisa a polimerização de nucleotídeos modificados no terminal 3'-OH (GJORRET et al., 2003) (Figura 8).

**Figura 7.** Imagens fluorescentes para H2DCFDA (A), CellTracker<sup>®</sup> Blue (B) e Mitotracker<sup>®</sup> Red (C) (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017). Barra de escala: 75  $\mu$ m.



**Figura 8.** Fotomicrografia de epifluorescência de oócito caprino de folículo pré-antral, apresentando fragmentação do DNA, após ser submetido à técnica de TUNEL (Fonte: Adaptado de Gouveia et al., 2016).



Dentro de um programa de PIV, as análises supracitadas são de suma importância, uma vez que, para esta biotécnica, estimar a qualidade e viabilidade oocitária é o ponto chave para se obter excelentes taxas de maturação e consequente fecundação *in vitro*.

## **2. JUSTIFICATIVA**

Atualmente, a produção *in vitro* de embriões caprinos, é marcada por taxas insatisfatórias, quando comparada aos resultados observados em outras espécies, à exemplo das espécies humana e bovina. Diante disso, se faz necessário um conhecimento mais aprofundado da fisiologia dos oócitos caprinos, bem como das suas exigências metabólicas, o que resulta por sua vez, no fornecimento de informações fundamentais para a formulação dos meios de cultivos, a fim de se obter melhores taxas de MIV, e conseqüente, fecundação destas células. Um fator que culmina para a instabilidade destas taxas, é a influência negativa da elevada produção de ERO, que afeta o desenvolvimento embrionário *in vitro*, nos sistemas de cultivos convencionais. Isto ocorre, principalmente, na fase de maturação do oócito, em virtude do excesso de manipulação, exposição à luz e alta tensão de O<sub>2</sub>, ocasionando o desequilíbrio no mecanismo de oxido-redução.

Neste sentido, faz-se necessária à otimização da MIV caprina, através da adição de substâncias alternativas com potencial antioxidante a exemplo da quercetina em substituição ao antioxidante convencional cisteamina, o qual tem elevado o custo da composição do meio de maturação *in vitro* de oócitos.

O antioxidante quercetina tem demonstrado capacidade de promover proteção às células contra o estresse oxidativo, passando a favorecer a redução de custos na MIV, associando, com uma maior viabilidade celular e conseqüente incremento das taxas de MIV de oócitos caprinos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Avaliar o efeito da quercetina como antioxidante alternativo à cisteamina na maturação *in vitro* de oócitos caprinos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito da suplementação de 4  $\mu\text{M}$  ou 8  $\mu\text{M}$  de quercetina em substituição à cisteamina no meio de maturação *in vitro* de oócitos caprinos sobre:
  - A taxa de maturação *in vitro* de complexos cumulus-oócitos caprinos;
  - O grau de expansão das células do cumulus após a maturação *in vitro* de oócitos caprinos;
  - A proporção de oócitos com retração nuclear;
  - A produção de GSH e ERO durante o processo de maturação *in vitro* de oócitos caprinos;
  - A atividade mitocondrial presente no ooplasma após a maturação *in vitro* de oócitos caprinos;
  - Avaliação do estágio de cromatina e quantificação de oócitos com fragmentação de DNA.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Aspectos éticos**

A presente dissertação faz parte do projeto “Efeito da inclusão de quercetina e pentoxiflina na produção *in vitro* de embriões caprinos no semiárido do Nordeste do Brasil”, o qual foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIVASF e pelo Comitê de Ética e Deontologia em Estudos e Pesquisas – CEDEP/UNIVASF, sob o protocolo de número 0004/120215.

### **4.2. Meios e reagentes**

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EUA), com exceção do soro de cabra em estro (SCE). Quando necessário, os meios foram ajustados quanto ao pH para valores entre 7,15 a 7,25.

### **4.3. Local de execução**

O experimento foi realizado no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA) e no laboratório de biologia celular, citologia e histologia (BIOFOV) - UNIVASF.

### **4.4. Recuperação e seleção de oócitos**

Ovários caprinos (n =176) foram obtidos em abatedouro local e transportados, em até 3 horas, até o laboratório, em solução de NaCl 0,9% (Fresenius<sup>®</sup>, Dismed, Brasil) a 30°C, em garrafa térmica (Onix<sup>®</sup>, Soprano, Brasil), conforme a metodologia de Souza-Fabjan et al. (2016). Os ovários foram lavados três vezes em solução salina aquecida e, posteriormente, acondicionados em banho-maria (MODEL 1102<sup>®</sup>, Fanem, Brasil), a 30°C (Figura 9). Para a colheita dos oócitos (Figura 10), foi utilizada uma bomba de vácuo (BV 003<sup>®</sup>, WTA, Brasil), a uma pressão de 6 a 8 mL/min, agulha 18G (SOLIDOR<sup>®</sup>, Lamedid Comercial & Serviços, Brasil) e o meio de recuperação TCM199, suplementado com 50 UI/mL de heparina, 50 µg/mL de gentamicina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Logo após a colheita, os

complexos cumulus oócitos (CCOs) foram dispostos em placas de petri de 60 mm (Placa de Petri 60<sup>®</sup>, Nutricell, Brasil), sendo analisados sob estereomicroscópio (SMZ 645<sup>®</sup>, Nikon, Japão) e classificados em diferentes graus de acordo com a presença das células do *cumulus* e características do ooplasma, segundo a metodologia de Avelar et al. (2012) (Figura 11). Somente CCOs de Grau I (várias camadas de células do *cumulus* compactas, citoplasma granuloso e homogêneo em toda zona pelúcida) e II (três camadas de células do *cumulus* e citoplasma finamente granuloso) foram selecionados para a maturação *in vitro*.

**Figura 9.** Ovários em banho-maria a 30°C (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).



**Figura 10.** Punção dos ovários com bomba a vácuo (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).





**Figura 11.** Avaliação de oócitos (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).



#### **4.5. Maturação *in vitro* de oócitos (MIV)**

Os CCOs de melhor qualidade ( $n = 426$ ) foram lavados em meio de recuperação até o momento da maturação. Posteriormente, foram homogeneamente divididos em três grupos de maturação: no Grupo CIS (controle), os CCOs foram imersos em meio composto de TCM-199, suplementado com EGF ( $10 \mu\text{g/mL}$ ), FSH/LH ( $10 \mu\text{L/mL}$ ), soro de ovelha em estro ( $100 \mu\text{L/mL}$ ) e cisteamina ( $10 \mu\text{L/mL}$ ); já nos Grupos Q4 e Q8, os CCOs foram imersos no meio controle, porém sem cisteamina e com  $4 \mu\text{M}$  ou  $8 \mu\text{M}$  de quercetina, respectivamente. Os CCOs foram dispostos em placas de cinco poços (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Nutricell, Brasil), em número de 50 CCOs por poço de  $500 \mu\text{L}$  de meio MIV, sob óleo mineral, durante 24 horas, em estufa de cultivo, a  $38,5^\circ\text{C}$ , em uma atmosfera umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### **4.6. Avaliação da MIV**

##### **4.6.1. Avaliação morfológica**

Para a avaliação da expansão das células do cumulus, os oócitos maturados foram avaliados sob estereomicroscópio (SMZ 645<sup>®</sup>, Nikon, Tóquio, Japão), segundo a metodologia de Avelar et al., (2012), quanto à presença e ausência de expansão das células do cumulus. Além disso, foi estimado o grau de expansão das células do

cumulus, classificando-os em: Total (Grau 1), Moderado (Grau 2) e Leve (Grau 3), conforme a metodologia de Aghaz et al. (2015).

#### **4.6.2. Avaliação de configuração de cromatina e fragmentação de DNA oocitário**

Ao final da etapa de maturação, os oócitos foram submetidos ao ensaio de TUNEL segundo a metodologia de Gouveia et al. (2016). Para tanto, os oócitos foram desnudos, fixados em solução de paraformaldeído a 4%, por 1 h, a 37°C. Inicialmente, os oócitos foram lavados três vezes em Solução salina tamponada/Polivinilpirrolidona e, posteriormente, fixados e armazenados em eppendorf (Tubo Eppendorf 1,5<sup>®</sup>, Eppendorf do Brasil, Brasil), com 400 µL de PBS-PVP, a 4°C, em freezer (Freezer Horizontal H400<sup>®</sup>, Electrolux, Suécia). Em seguida, os oócitos foram incubados em gotas de 100 µL de solução de permeabilização [0,1% (v/v) de Triton X-100 em PBS 10 mM], durante 3 h, a 37°C. Os controles positivos e negativos foram incubados em gotas de 100 µL, contendo DNase livre de RNase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), a temperatura ambiente, durante 1 h e lavados 3 vezes em gotas de 50 µL de PBS-PVP. O ensaio de TUNEL foi preparado por cerca de 15 minutos antes da utilização e mantido, tal como indicado pelo fabricante a 4°C (Kit de detecção de morte celular in situ, Fluoresceína: Boehringer Mannheim/Roche, Diagnósticos Ltd, Indianapolis, USA). Para esta utilização final, foi feito 112,5 µL de enzima deoxinucleotídeo transferase (DTT) e 112,5 µL de solução marcadora de 2-desoxiuridina trifosfato de 5-FITC (FITC-dUTP) para se obter 125 µL de mistura de TUNEL, para a reação. Os tratamentos experimentais e o controle positivo foram incubados com 15 µL desta solução, durante 1 hora, a 37 °C, numa câmara úmida (Equilam<sup>®</sup>, KEQ300UM, Brasil), na ausência de luz. O controle negativo foi incubado com 15 µL da solução marcadora. Em seguida, os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50 µL PBS-PVP e incubados em gotas de 50 µL, contendo 5 µL/mL de Hoechst 33342 em PBS 10 mM, durante 15 minutos, a temperatura ambiente, no escuro. Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de 50 µL de PBS-PVP e as lâminas (Coleman<sup>®</sup>, Roster, Brasil) foram preparadas para posterior leitura em microscópio de epifluorescência (Nikon E200<sup>®</sup>, Nikon, Japão), com uma ampliação de 400x. Posteriormente, segundo a metodologia de Rajabi et al. (2013), os respectivos oócitos foram submetidos a

avaliação de cromatina, onde verificou-se os diferentes estágios meióticos de cada estrutura celular: Vesícula germinativa (VG), Vesícula germinativa rompida (VGBD), Metáfase I (MI) e Metáfase II (MII).

#### **4.6.3. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo (níveis intracelulares de ERO e GSH) e mitocôndrias metabolicamente ativas**

Após a MIV, 10 oócitos maduros de cada grupo experimental foram desnudos e os níveis intracelulares de glutatona reduzida (GSH) e ERO e de atividade mitocondrial foram quantificados como descrito por Lins et al. (2016), com sutis modificações. Resumidamente, 4-clorometil-6.8-difluoro-7-hidroxicumarina (CellTracker Blue<sup>®</sup>; CMF2HC<sup>®</sup>; Invitrogen Corporation, Carlsbad, Estados Unidos), 2', 7'- diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H2DCFDA<sup>®</sup>, Invitrogen Corporation) e MitoTracker Red (MitoTracker Red<sup>®</sup>, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Austrália) foram utilizados para detectar os níveis intracelulares de GSH, ERO e de atividade mitocondrial através das fluorescências azul, verde e vermelho, respectivamente. Para tanto, os oócitos foram desnudos e incubados (na ausência de luz) durante 30 minutos em PBS (PBS Buffer<sup>®</sup>, Bio-Rad Laboratories Ltda., Portugal), suplementado com 10 mM de 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína e 10 mM de CellTracker<sup>®</sup> e 100 mM de MitoTracker Red, a 37°C. Após coloração, os oócitos foram lavados com PBS (PBS Buffer<sup>®</sup>, Bio-Rad Laboratories Ltda., Portugal) e a fluorescência foi observada em microscópio de epifluorescência (E200<sup>®</sup>; Nikon, Tóquio, Japão) com filtros de UV de 370 nm, 460 nm e 579-599 nm para GSH, ERO e atividade mitocondrial, respectivamente, sendo as imagens fluorescentes salvas em formato TIFF. As intensidades de fluorescência dos oócitos foram analisadas utilizando o software Image J (versão 1.47<sup>®</sup>; National Institutes of Health<sup>®</sup>, Bethesda, MD, EUA).

#### **4.7. Parâmetros avaliados**

Foram registradas as seguintes variáveis: Taxa de maturação oocitária; Proporção de oócitos em cada grau de expansão das células do cumulus; Proporção de oócitos maduros com retração nuclear; Quantificação dos níveis de GSH;

Quantificação dos níveis de ERO; Quantificação de atividade mitocondrial; Avaliação de configuração de cromatina e quantificação de fragmentação de DNA.

#### **4.8. Análise estatística**

Os dados de taxas de maturação, taxas de expansão das células do cumulus, retração, taxas de diferentes graus de expansão das células do cumulus e o percentual de oócitos com fragmentação de DNA, foram expressos em percentuais e comparados, utilizando o teste do Qui-quadrado, por meio do software estatístico Epi Info (Epi Info 7.1.5.0, Atlanta, GA, EUA, 2015). Os dados de níveis de GSH, ERO e atividade mitocondrial foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias. Em seguida, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparações entre os grupos. Quando os principais efeitos ou interações foram significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## 5. Resultados

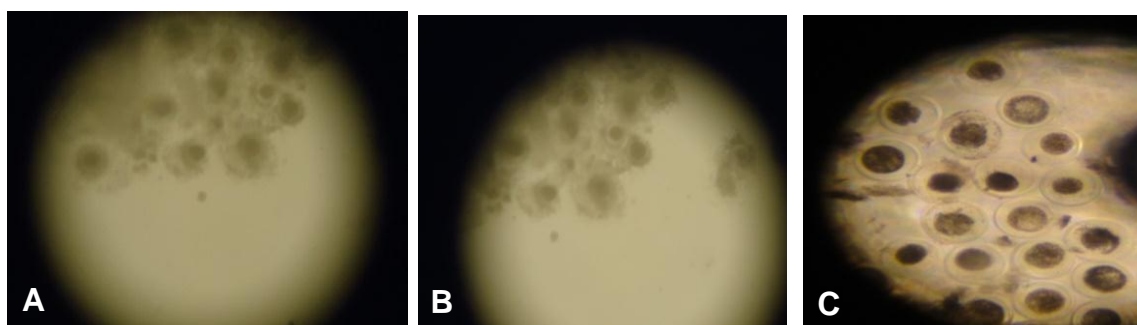
O percentual de expansão de células do cumulus foi similar ( $P>0,05$ ) entre os grupos CIS e Q4, sendo ambos os grupos, significativamente, superiores ao tratamento Q8. Após 24 h do início da maturação, a taxa de retração oocitária em meio contendo 8  $\mu\text{M}$  de quercetina foi superior ( $P<0,001$ ) aos demais tratamentos (Tabela 2: Figura 12).

**Tabela 2** – Taxa de expansão de células do cumulus e retração oocitária (%) em complexos cumulus oócitos (CCOs) caprinos, maturados *in vitro*, no grupo controle (Grupo CIS) ou em meio contendo 4  $\mu\text{M}$  (Grupo Q4) ou 8  $\mu\text{M}$  (Grupo Q8) de quercetina (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).

Tratamentos	Taxa de expansão oocitária (n)	Taxa de retração oocitária (n)
CIS	67,6% (96) <sup>a</sup>	9,8% (14) <sup>b</sup>
Q4	71,8% (102) <sup>a</sup>	7,7% (11) <sup>b</sup>
Q8	46,4% (66) <sup>b</sup>	38,0% (54) <sup>a</sup>

<sup>a, b</sup> Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P<0,05$ ).

**Figura 12.** Oócitos caprinos expandidos, maturados *in vitro*, no grupo controle (Grupo CIS; A) ou em meio contendo 4  $\mu\text{M}$  (Grupo Q4; B) ou 8  $\mu\text{M}$  (Grupo Q8; C) de quercetina. (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017). Aumento de 70 X.



No tocante aos graus de expansão das células do cumulus, o tratamento contendo 8  $\mu\text{M}$  de quercetina apresentou menor proporção de oócitos expandidos com Grau 1 (Total), comparado aos tratamentos controle e Q4 ( $P<0,05$ ) e, ao

mesmo tempo, maior proporção de oócitos expandidos com Grau 3 (Leve) ( $P < 0,05$ ) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Efeito da inclusão de quercetina sobre o grau de expansão das células do cumulus de oócitos caprinos, maturados *in vitro*, no grupo controle (Grupo CIS) ou em meio contendo 4  $\mu\text{M}$  (Grupo Q4) ou 8  $\mu\text{M}$  (Grupo Q8) de quercetina (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).

Tratamentos	Graus de expansão			
	G1 - Total (n)	G2 - Moderado (n)	G3 - Leve (n)	G1 + G2(n)
CIS	72,5% (34) <sup>a</sup>	36,2% (17) <sup>a</sup>	12,7% (6) <sup>b</sup>	87,2% (41) <sup>a</sup>
Q4	53,2% (25) <sup>a</sup>	29,8 (14) <sup>a</sup>	17% (8) <sup>b</sup>	83,0% (39) <sup>a</sup>
Q8	12,8% (6) <sup>b</sup>	12,8% (6) <sup>b</sup>	74,4% (35) <sup>a</sup>	25,5% (12) <sup>b</sup>

<sup>a, b</sup> Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). n: número de oócitos expandidos.

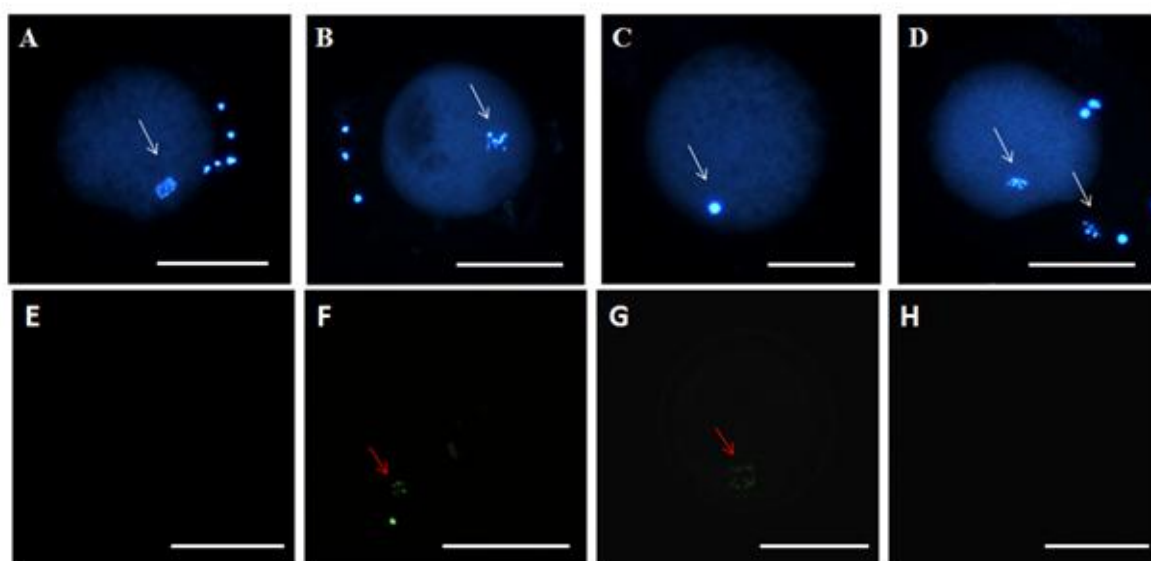
Com relação à taxa de maturação nuclear, o percentual de oócitos que alcançaram o estágio de metáfase II foi maior nos oócitos maturados em meio suplementado com 4  $\mu\text{M}$  de quercetina, quando comparados aos oócitos maturados no tratamento CIS ( $P < 0,05$ ), não havendo diferença significativa para tal parâmetro entre os grupos CIS e Q8 (Tabela 4; Figura 13).

**Tabela 4** – Taxa de maturação nuclear de oócitos caprinos, maturados *in vitro*, no grupo controle (Grupo CIS) ou em meio contendo 4  $\mu\text{M}$  ou 8  $\mu\text{M}$  de quercetina (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017).

Tratamentos	Estágios de maturação nuclear, n (%)			
	VG	VGBD	MI	MII
CIS	0 (0)	4 (25,0)	8 (50,0)	4 (25,0) <sup>a</sup>
Q4	0 (0)	5 (23,8)	4 (19,1)	12 (57,1) <sup>b</sup>
Q8	2 (11,8)	2 (11,8)	5 (29,4)	8 (47,0) <sup>ab</sup>

<sup>a, b</sup> Valores com letras sobrescritas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ).

**Figura 13.** Configuração da cromatina após MIV, mostrando oócitos em vesícula germinativa após tratamento com Q8 (A); quebra da vesícula germinativa após tratamento com Q4 (B); MI após tratamento com CIS (C) e MII após tratamento com Q4 (D). Ausência de marcação do TUNEL no controle negativo (E); fragmentação de DNA no controle positivo da reação (F) e no tratamento CIS (G); ausência de marcação no tratamento Q4 (H). Seta branca indica cromatina marcada com Hoestch. Setas vermelhas indicam cromatina marcada com TUNEL (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017). Barra de escala: 75  $\mu$ m.

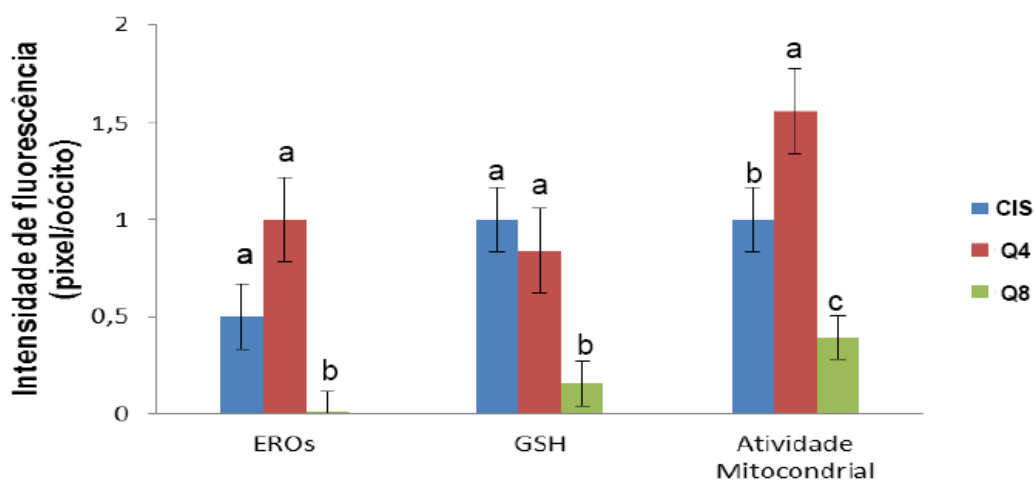


Com relação ao percentual de oócitos apresentando fragmentação de DNA, houve um aumento significativo ( $P < 0,05$ ) de células TUNEL-positivas no grupo controle, contendo cisteamina (28,2%), quando comparado aos grupos contendo 4 (0%) ou 8 (0%)  $\mu$ M de quercetina.

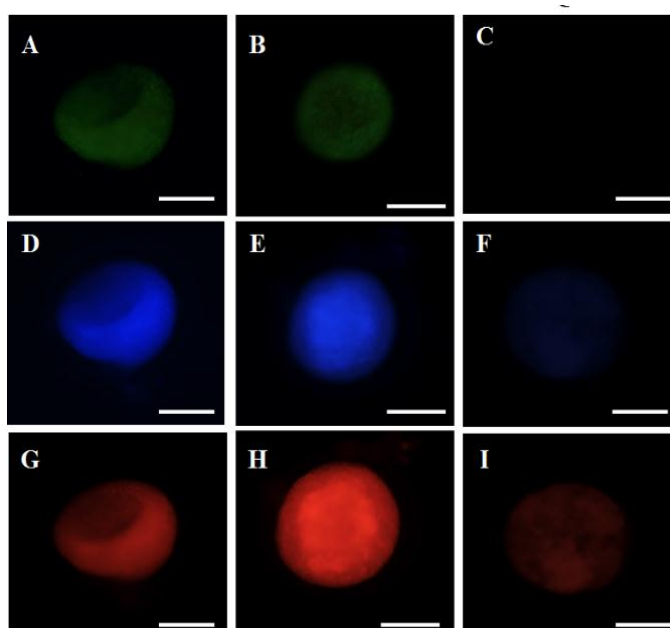
No tocante à emissão de fluorescência quantificada através do número de pixels, os níveis intracelulares oocitários de ERO, GSH e de atividade mitocondrial estão demonstrados na Figura 14. Os oócitos tratados com 8  $\mu$ M de quercetina apresentaram menores ( $P < 0,05$ ) níveis de ERO e GSH que aqueles maturados nos grupos CIS e Q4, entre os quais não houve diferença significativa ( $P > 0,05$ ). Já com relação à atividade mitocondrial, os oócitos maturados na presença de 4  $\mu$ M de quercetina (Q4) foram significativamente superiores ( $P < 0,05$ ) que aqueles tratados nos grupos CIS e Q8. Ainda com relação à atividade mitocondrial, é importante destacar que os oócitos maturados no grupo Q8 foram significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) que aqueles maturados nos grupos CIS e Q4.

**Figura 14.** (1) Níveis intracelulares ERO, GSH e atividade mitocondrial (pixel / oócito), maturados no grupo controle (CIS) ou em meio contendo 4  $\mu\text{M}$  (Q4) ou 8  $\mu\text{M}$  (Q8) de quercetina. As letras diferentes entre colunas, dentro de cada parâmetro, indicam diferença significativa ( $P < 0,05$ ). (2) Fotomicrografia de epifluorescência de oócitos caprinos corados com diclorodihidrofluoresceína (A, B, C), Cell Tracker azul (D, E, F) e MitoTracker Red (G, H, I), detectando os níveis intracelulares ERO, GSH e atividade mitocondrial (pixel / oócito), respectivamente, maturados no grupo controle (A, D, G) ou em meio contendo 4  $\mu\text{M}$  (B, E, H) ou 8  $\mu\text{M}$  (C, F, I) de quercetina (Fonte: Arquivo Pessoal, 2017). Barra de escala: 75  $\mu\text{m}$ .

(1)



(2)





## 6. Discussão

Em nosso conhecimento, este estudo é o primeiro a relatar os feitos da inclusão de quercetina em substituição à cisteamina na maturação *in vitro* de oócitos caprinos. Os meios de MIV suplementados com 4  $\mu\text{M}$  de quercetina (Q4) ou 100  $\mu\text{M}$  de cisteamina (CIS) apresentaram taxas similares de expansão de células do cumulus e retração oocitária (não promoveram danos celulares). Nossos resultados são semelhantes aos encontrados por Orlovschi, Miclea e Zhan (2014), que observaram excelentes taxas de expansão de células do cumulus em oócitos suínos maturados em meio contendo 25  $\mu\text{g/mL}$  de quercetina. Estes resultados sugerem que a suplementação com quercetina ou cisteamina, nas concentrações supracitadas, pode influenciar o processo de mucificação da célula oocitária, bem como sua qualidade.

Por outro lado, a suplementação de 8  $\mu\text{M}$  de quercetina ao meio de MIV resultou numa menor taxa de expansão de células do cumulus e maior percentual de retração oocitária, quando comparado aos demais tratamentos. Uma possível razão para este fenômeno é que a estrutura molecular deste flavonoide é semelhante à estrutura de estrógenos e pode, possivelmente, interagir com seus receptores, atuando como um fitoestrógeno. Dessa forma, na concentração testada, a quercetina modularia a atividade oocitária (ORLOVSCHI; MICLEA; ZHAN, 2014), resultando na redução de síntese e liberação de secreção de  $17\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) e na da síntese de fatores de crescimento pelas células da granulosa (SANTINI et al., 2009), influenciando, assim, o ambiente celular e, conseqüentemente, reduzindo o potencial de expansão das células do cumulus, uma vez que o  $\text{E}_2$  possui um importante papel pra a mucificação das células intrafoliculares (KUBO; ILSE; MITANO et al., 2015).

Em nosso estudo, observamos um maior percentual de oócitos que atingiram metáfase II no grupo Q4, quando comparados àqueles maturados no grupo controle (CIS), esses achados diferem dos observados por Guemra et al. (2013), que não verificaram diferenças significativas após MIV de oócitos bovinos em meio com cisteamina e/ou quercetina. É importante salientar que a maturação nuclear não depende diretamente da expansão das células do cumulus (CROCOMO et al., 2015), como já verificado em estudos anteriores em oócitos bovinos (SHIRAZI et al.,

2007) e caprinos (HAND et al., 2006). Apesar da quercetina não atuar diretamente na maturação nuclear ou citoplasmática (KANG et al., 2013), no presente trabalho, a taxa de maturação observada em meio contendo 4  $\mu\text{M}$  de quercetina pode ser explicada pela maior atividade mitocondrial e menor fragmentação de DNA observadas nos oócitos deste tratamento, quando comparado ao grupo controle (CIS). A atividade mitocondrial em oócitos é considerada um excelente marcador de qualidade e viabilidade celular. Uma vez ativas, as mitocôndrias asseguram competência funcional dos oócitos, principalmente, durante a maturação nuclear e/ou citoplasmática (MOUSSA et al., 2015), sendo que esse potencial é maior em oócitos maduros do que o observado em oócitos imaturos (TARAZONA et al., 2006). Somado a isso, as mitocôndrias desempenham um importante papel na morte celular programada, uma vez que esse processo é iniciado por sinais intracelulares e extracelulares pela via intrínseca, também conhecida como via mitocondrial, culminando na disfunção mitocondrial e consequente morte celular (TANABE et al., 2015).

Nossos resultados corroboram com os encontrados por Jia, Lin e Zhang (2011), quando realizaram o cultivo de folículos de galinhas com citotoxicidade induzida por cádmio. Estes autores observaram que a inclusão de quercetina ao meio *in vitro* reduziu o número de células apoptóticas e sugeriram que tais resultados são justificados em razão do potencial antioxidante da quercetina, que protege, eficientemente, a célula de possíveis lesões e, conseqüentemente, assegura menor incidência de apoptose. Desta forma, sugerimos que a maior maturação oocitária após suplementação com 4  $\mu\text{M}$  de quercetina pode estar associada com uma maior qualidade intrínseca do oócito, conferindo a este, maior capacidade de retomar a meiose (CROCOMO et al., 2013).

Os efeitos positivos da quercetina e da cisteamina durante a maturação ou cultivo *in vitro* de oócitos são atribuídos ao seu potencial antioxidante, que, em concentrações adequadas, são capazes de mediar o equilíbrio da produção de ERs, resultando, por sua vez, em células com melhor qualidade e viabilidade (ORLOVSKI; MICLEA; ZHAN, 2014). Entretanto, não observamos diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nos níveis de ERO e GSH intracelulares entre os grupos CIS e Q4. Nossos dados diferem dos achados por Guemra et al. (2013), que encontraram menores níveis de GSH em oócitos maturados na presença de quercetina (2 e 10  $\mu\text{M}$ ). A quercetina equilibra a produção de ERO, por interagir com

íons superóxido, quelar íons ferro e por reduzir a peroxidação lipídica, que culmina, por sua vez, na redução dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo (JOHINKE; DE GRAAF; BATHGATE, 2014). No entanto, dependendo da concentração, a quercetina pode proporcionar o aumento ou redução nos níveis de GSH nos oócitos. Somado a isso, os oócitos são, naturalmente, portadores de GSH endógena, a qual é encontrada em maior quantidade durante a fase de maturação, sobretudo em oócitos no estágio de metáfase II. Suas concentrações podem ser alteradas, dependendo do protocolo de sistema de cultivo celular *in vitro* adotado no laboratório (LIU et al., 2010).

A concentração de 8  $\mu\text{M}$  de quercetina reduziu os níveis de ERO, GSH e mitocôndrias ativas. Resultados semelhantes aos obtidos em nossos estudos foram observados em espermatozoides bovinos (TVRD et al., 2016) e de humanos (KHANDUJA et al., 2002), à medida que acrescentava quercetina aos diluidores de sêmen. Tais autores sugerem que, em concentrações elevadas, a quercetina diminui a atividade modulatória de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, resultando no maior influxo de cálcio intracelular, culminado, por sua vez, em lesões celulares e na consequente disfunção mitocondrial, o que resulta, na diminuição de atividade mitocondrial e menor produção de ERO pela mitocôndria.

### III. CONCLUSÕES

Em conclusão, 4  $\mu\text{M}$  de quercetina pode ser utilizada como alternativa à cisteamina na maturação *in vitro* de oócitos de caprinos. Pois, a quercetina a 4  $\mu\text{M}$  promoveu taxas de maturação oocitária de caprinos maiores que àquelas obtidas com o antioxidante padrão cisteamina, mantendo constantes os níveis de glutathione e ERO. Além de elevar a atividade mitocondrial oocitária, assegurando maior viabilidade e qualidade celular. Contudo, na concentração de 8  $\mu\text{M}$ , a quercetina demonstra ser citotóxica aos oócitos caprinos, levando à redução dos níveis de espécies reativas de oxigênio, de glutathione e a atividade mitocondrial oocitária, demonstrando menor viabilidade celular.

Contudo, faz-se necessário a realização de mais estudos a fim de encontrar uma concentração ótima de quercetina na maturação *in vitro* de oócitos caprinos e consequente fecundação *in vitro*, culminando na produção *in vitro* de embriões.

#### IV. REFERÊNCIAS

- AFANAS'EV, I.B.; DOROZHKO, A.I.; BRODSKII, A.V. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, v.38, p.1763-1769, 1989.
- AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.A.; SAID, T.M. Prevention of oxidative stress injury to sperm. **Journal of Andrology**, v.26, p.654–60, 2005.
- 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**, v. 84, p.1631–1635, 2015.
- ALI, M.R.; BEHZAD, M.; ZADEH, C.N. CHAMBARY. Effect of different diluents and storage time on field fertility of cooled ram semen after vaginal insemination. **Small Ruminant Research**, v.115, p.82-85, 2013.
- ALRAWAIQ, N.S.; ABDULLAH, A. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. **International Journal of Pharm Tech Research**, v.6, p.933-941, 2014.
- ARMSTRONG, D.T.; KOTARAS, P.J.; EARL, C.R. Advances in production of embryos in vitro from juvenile and prepubertal oocytes from the calf and lamb. **Reproduction Fertility and Development**, v. 9, p. 333-339, 1997.
- ANEL, L.; SEVILLANO, C.; ALVAREZ, M.; ALEGRE, B.; ANEL, E.; DOMÍNGUEZ, C.; ANGUITA, B.; JIMENEZ-MACEDO, A.R.; IZQUIERDO, D.; MOGAS, T.; PARAMIO, M.T. Effect of oocyte diameter on meiotic competence, embryo development, p34 (cdc2) expression and MPF activity in prepuberal goat oocytes. **Theriogenology**, v.67, p.526-536, 2007.
- AVELAR, S.R.G.; MOURA, R.R.; SOUSA, F.C.; PEREIRA, A.F.; ALMEIDA, K.C.; MELO, C.H.S.; TELES-FILHO, A.C A.; BARIL, G.; MELO, L.M.; TEIXEIRA, D.I.A.; FREITAS, V. J. F. Oocyte production and *in vitro* maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. **Animal Reproduction**, v.9, p.27-32, 2012.

BARRETTO, L.S.S. Avaliação dos efeitos da inibição da maturação nuclear e de antioxidantes sobre a maturação oocitária, fecundação e desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*. Jaboticabal-SP, 2007. 88p **Monografia** (Tese de doutorado), 2007- Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

BERNADI, M.L. Produção *in vitro* de Embriões Ovinos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.33, p1-16, 2005.

BEHLING, E.B.; SENADAO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.M. G, BIANCHI, M.L.P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e Ações biológicas. *Alimentação e Nutrição*, v. 15, p. 285-92, 2004.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista Nutrição**, v. 12, p. 123-130, 1999.

BRISTOL-GOULD S.; WOODRUFF T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v.66, p.5–13, 2006.

BYRNE, A.T.; SOUTHGATE, J.; BRISON, D.R.; LEESE, H.J. Analysis of apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.117, p.97–105, 1999.

CAN, A.; SEMIZ, O.; CINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.9, p.749-756, 2003.

CHOI, J.Y.; KANG, J.T.; PARK, S.J.; KIM, S.J.; MOON, J.H.; SAADELDIN, I.M.; JANG, G.; LEE, B.C. Effect of 7, 8-Dihydroxyflavone as an antioxidant on *in vitro* maturation of oocytes and development of parthenogenetic embryos in pigs. **The Journal of Reproduction and Development**, v. 59, p. 450-456, 2013.

CIRCU, M.L.; AW, T.Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p. 749-762, 2010.

CLARK, A.R.; STOKES, Y.M.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus–oocyte complexes.

**Reproduction**, v. 131, p. 999-1006, 2006.

COELHO, L.A.D.; ESPER, C.R.; ALVAREZ, R.H.; VANTINE, R.; ALMEIDA JUNIOR, I.L. Produção *in vitro* de embriões bovinos: utilização de diferentes fontes de gonadotrofinas na maturação dos oócitos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1117-1121, 2002.

COGNIÉ, Y.; POULIN, N.; LOCATELLI, Y.; MERMILLOD, P. State of the production, conservation and transfer of *in vitro* produced embryos in small ruminants.

**Reproduction, Fertility and Development**, v.16, p.437-445, 2004.

CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; ULIAN, C.M.V.; BRANCHINI, N.S.; SILVA, D.T.; ACKERMANN, C.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D.; Effect of oil overlay on inhibition potential of roscovitine in sheep cumulus-oocyte complexes. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 50, p.410-416, 2015.

CROCOMO, L.F.; MARQUES FILHO, W.C.; SUDANO, M.J.; PASCHOAL, D.M.; ALVARENGA, F.C.L.; BICUDO, S.D. Effect of roscovitine and cycloheximide on ultrastructure of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**, v.109, p.156–162, 2013.

DUARTE, A.B.G.; CHAVES, R.N.; ARAÚJO, V.R.; CELESTINO, J.J.H.; SILVA, G.M.; LOPES, C.A.P.; TAVARES, L.M.T.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R. Follicular interactions affect the *in vitro* development of isolated goat preantral follicles. **Zygote**, v. 19, p. 215-227, 2010.

FAVALORO, B.; ALLOCATI, N.; GRAZIANO, V.; DI ILLIO, C.; DE LAURENZI, V. Role of apoptosis in disease. **Aging**, v.4, p. 330-349, 2012.

FERREIRA, E.M.; VIREQUE, A.A.; ADONA, P.R.; MEIRELLES, F.V.; FERRIANI, R.A.; NAVARRO, P.A.A.S. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence.

**Theriogenology**, v. 71, p. 836-848, 2009.

FIGUEIREDO, J.R.; CELESTINO, H.J.J.; RODRIGUES, A.P.R.;

SILVA, J.R.V. **Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais**. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal, 2. ed. São Paulo: Roca, p. 303–327, 2008.

FUKUI, Y.; GLEW, A.W.; GANDOLFI, F.; MOOR, R.M. Ram-specific effects on in-vitro fertilization and cleavage of sheep oocytes matured in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.82, p. 337- 340, 1988.

GALLI, C.; CROTTI, G.; NOTARI, C. Embryo production by ovum pick-up from live donors. **Theriogenology**, v. 55, p. 1341-1357, 2001.

GANDHI, A.P.; LANE, M.; GARDNER, D.K.; KRISHER, R.L. A single medium supports development of bovine embryos throughout maturation, fertilization and culture. **Human Reproduction**, v.15, p.395-401, 2000.

GARGOURI, B.; MANSOUR, R.B.; ABDALLAH, F.B.; ELFEKIH, A.; LASSOUED, S.; KHALED, H. Protective effect of quercetina against oxidative stress caused by dimethoate in human peripheral blood lymphocytes. **Lipids Health Diseases**, v. 10, p. 149, 2011.

GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.6–15, 2007.

GJORRET, J.O.; KNIJIN, H.M.; DIELEMAN, S.J.; AVERY, B.; LARSSON, L.I.; HYTTEL, M. Cronology of apoptosis in bovine embryos produced *in vivo* and *in vitro*. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1193-1200, 2003.

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: Varela, p. 340, 2008.

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Annales et Endocrinologie (Paris)**, v. 71, p.132-43, 2010.



GOUVEIA, B.B.; MACEDO, T.J.S.; SANTOS, J.M.S.; BARBERINO, R.S.; MENEZES, V.G.; MÜLLER, M.C.; ALMEIDA, J.R.G.S.; FIGUEIREDO, J.R.; M.H.T. MATOS.

Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, p. 1275–1284, 2016.

GREEN, D.R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-629, 2004.

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

GUÉRIN, P.; MOUATASSIM, S.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction**, v.7, p.175-189, 2001.

GUIMARÃES, A.L. Avaliação de diferentes sistemas de maturação para aumentar a competência de ovócitos bovinos. 84f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Animais) Universidade de Brasília, Faculdade de Agronomia e Veterinária, Brasília, 2013.

HAND, L.G.; WU, Y.H.; WANG, H.; TAN, J. Factors affecting the efficiency and reversibility of roscovitine (ROS) block on the meiotic resumption of goat oocytes. **Molecular Reproduction**, v.73, p.238-246, 2006.

HARTWIG, F.P.; LISBOA, E.P.; HARTWIG, F.P.; MONTEIRO, G.A.; MAZIERO, R.R.; FREITAS-DELL'AQUA, C.P.; ALVARENGA, M.A.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JÚNIOR, J.A. Use of cholesterol-loaded cyclodextrin: an alternative for bad cooler stallions. **Theriogenology**, v.81, p.340-346, 2014.

HOSHI, H. In vitro production of bovine embryos and their application for embryo transfer. **Theriogenology**, v.59, p.675-685, 2003.

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Humam Reproduction Up**, v. 11, p. 162-178, 2005.

HUTT, K. The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. **Reproduction**, v. 149, p. 1470-1626, 2015.

JAGARLAMUDI, K.; RAJKOVIC, A. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 356, p. 31-39, 2012.

JAIN, T.; JAIN, A.; KUMAR, P.; GOSWAMI, S.L.; DE S.; SINGH, D.; DATTA, T.K. Kinetics of GDF9 expression in buffalo oocytes during in vitro maturation and their associated development ability. **General and Comparative Endocrinology**, v. 178, p. 477-484, 2012.

JIA, Y.; LIN, J.M.Y.; ZHANG, C. Quercetin attenuates cadmium-induced oxidative damage and apoptosis in granulosa cells from chicken ovarian follicles. **Reproductive Toxicology**, v. 31, p.477–85, 2011.

JOHINKE, D.; DE GRAAF, S.P.; BATHGATE, R. Quercetin reduces the in vitro production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during chilled storage of rabbit spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.151, p.208-219, 2014.

KANG, J.T.; KWON, D.K.; PARK, S.J.; KIM, S.J.; MOON, J.H.; KOO, O.J.; JANG, G.; LEE, B.C. Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. **Journal of Veterinary Science**, v.14, p. 15-20, 2013.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; OPIELA, J.; RYNSKA, B. Effects of oocyte quality, semen donor and embryo co-culture system on the efficiency of blastocyst production in goats. **Theriogenology**, v.68, p. 736-744, 2007.

KAWAMURA, K.; KUMAGAI, J.; SUDO, S.; CHUN, S.Y.; PISARSKA, M.; MORITA, H.; TOPPARI, J.; FU, P.; WADE, J.D.; BATHGATE, R.A. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proceedings of Natl Academic Scientiae**, v.101, p.7323-7328, 2004.

KELLY, G.S. Quercetin. **Alternative Medicine Review**, v. 16, p. 172-194, 2011.

KHANDUJA, K.L.; VERMA, A.; BHARDWAJ, A. Impairment of human sperm motility and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. **Andrologia**, v.33, p. 277-281, 2002.

- KIM, J.Y.; LEE, E.J.; PARK, H.D. Effect of MEM vitamins supplementation of *in vitro* maturation medium and *in vitro* culture medium on development of porcine embryos. **Asian-Australian Journal Animal Science**, v. 24, p. 1541-1546, 2011.
- KUBO, N.; ILSE, S.C.; MIYANO, T. Effect of estradiol-17 $\beta$  during *in vitro* growth culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of porcine oocytes from early antral follicles. **Journal Animal Science**, v.86, p. 251–59, 2015.
- LANE, M.; GARDNER, D.K. Amino acids and vitamins prevent culture induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts. **Human Reproduction**, v. 13, p.991–997, 2012.
- LIN, C.M.; CHEN, C.S.; CHEN, C.T.; LIANG, Y.C.; LIN, J.K. Molecular modeling of flavonoids that inhibits xanthine oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 294, p. 167- 172, 2002.
- LINS, T.L.B.G.; CAVALCANTE, A.Y.P.; SANTOS, J.M.S.; MENEZES, V.G.; BARROS, V.R.P.; BARBERINO, R.S.; BEZERRA, M.E.S.; MACEDO, T.J.; MATOS, M.H.T. Rutine can replace the use of three other antioxidants in the culture médium maintaining the viability of sheep isolate secondary follicles. **Theriogenology**, v. 89, p. 263–270, 2016.
- LIU, S.; HOU, W.; YAO, P. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary hepatocytes. **Toxicology In Vitro**, v.24, p.516-522, 2010.
- LIVINGSTON, T.; EBERHARDT, D.; EDWARDS, J.L.; GODKIN, J. Retinol improves bovine embryonic development in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 2, p. 83, 2004.
- LONERGAN, P.; RIZOS, D.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; MOREIRO, M.P.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, P.M. Temporal divergence in the pattern of messenger rna expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v.69, p.1424- 1431, 2003.
- LUCCI, C.M.; SILVA, R.V.; CARVALHO C.A. Light microscopical and ultrastrutural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 61- 69, 2001.

MARQUES, M.G.; NICACIO, A.C.; OLIVEIRA, V.P.; NASCIMENTO, A.; CAETANO H.V.A.; MENDES, C.M.; MELLO, M.R.B.; MILAZZOTTO, M.P.; ASSUMPÇÃO, M.E. O.A.; VISINTIN, J.A. *In vitro* maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. **Animal Reproduction Science**, v.97, p.375-381, 2007.

MAYER, L.P.; DEVINE, P.J.; DYER C.A. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. **Biology of Reproduction**, v.71, p.130-138, 2004.

MAYES, M.A.; SIRARD, M.A. Effect of type 3 and type 4 phosphodiesterase inhibitors on the maintenance of bovine oocytes in meiotic arrest. **Biology of Reproduction**, v.66, p. 180-184, 2002.

MEHAISEN, G.M.; SAEED, A.M.; GAD, A.; ABASS, A.O.; ARAFA, M.; EL-SAYED, A. Antioxidant capacity of melatonin on preimplantation development of fresh and vitrified rabbit embryos: morphological and molecular aspects. **Plos One**, v. 10, p. 1-16, 2015.

MEHLMANN, LM. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v.130, p.791–799, 2005.

MERCK, S.A. Bioflavonoides: Quercetina y rutina. **Laboratories Merck S.A.**, v. 1, p. 1-4, 2000.

MICLEA, I.; NICOLAE, P.; HETTIG, A.; ZĂHAN, M.; MICLEA, V. Alpha-tocopherol and Ascorbic Acid Combinations Influence the Maturation of Sheep Oocytes. **Animal Sciences and Biotechnologies**, v. 45, p.1-5, 2012.

MINGOTI, G.Z. **Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos**. In: *Tópicos Avançados em Biotecnologia da Reprodução*, 2005, Jaboticabal, SP. Jaboticabal, SP: Funep, 2005.

MORRIS, G.J.; GOODRICH, M.; ACTON, E.; FONSECA, F. The high viscosity encountered during freezing in glycerol solutions: effects on cryopreservation. **Cryobiology**, v.52, p.323-334, 2006.

MOUSSA, M.; SHU, J.; ZHANG, X.H.; ZENG, F. Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. **Animal Reproduction Science**, v. 155, p. 11-27, 2015.

MUDO, G.A.M; SILVA, H.A.L; RIBEIRO, L.G.; MEDINA, F.T.; CORDEIRO, M.F.; LOPES JÚNIOR, E.S. **Resposta folicular ovariana após diferentes tratamentos de estimulação ovarina de cabra pré-púbere**. XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia. FORTALEZA, 2015.

ORLOVSCHI, D.; MICLEA, I.; ZAHAN, M. Quercetin efficacy on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Animal Science and Biotechnologies**, v.1, p.47-51, 2014.

PACE-ASCIAK, C.R.; HAHN, S.; DIAMANDIS, E.P.; SOLEAS, G.; GOLDBERG, D.M. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: Implications for protection against coronary heart disease. **Clinical Chemical Acta**, v. 235, p. 207-219, 1995. .

PEPE, G.J.; BILLIAR R. B.; ALBRECHT, E.D. Regulation of baboon fetal ovarian folliculogenesis by estrogen. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.247, p.41-46, 2006.

PINTO, V.H.; CARVALHODA-SILVA, D.; SANTOS, J.L.; WEITNER, T.; FONSECA, M.G.; YOSHIDA M.I.; Thermal stability of the prototypical Mn porphyrin-based superoxide dismutase mimic and potent oxidative-stress redox modulator Mn(III) meso-tetrakis(N-ethylpyridinium-2-yl) porphyrin chloride, MnTE-2-PyP(5p). **Journal of Pharmacology Biomedical Analysis**, v.73, p.29–34, 2013.

PU, Y.; WANG, Z.; BIAN, Y.; ZHANG, F.; YANG, P.; LI, Y.; ZHANG, Y.; FANG, F.; CAO, H.; ZHANG, X. All-*trans* retinoic acid improves goat oocyte nuclear maturation and reduces apoptotic cumulus cells during *in vitro* maturation. **Animal Science Journal**, v.85, p.833–839, 2014.

RACHID, M.A.; VASCONCELOS, A.C.; NUNES, V.A. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histomorphometry of the bursa of Fabricius. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 52, p. 592-598, 2000.

RAJABI, R.T.; MOTAMEDI-MO, R.J.D.; MOHAMMA, E.; ROOSTAEI-ALI M.; REIHANEH, M. Effect of Papaver rhoeas L. extract on in vitro maturation of sheep oocytes. **Small Ruminant Research**, v.114, p.146– 151, 2013.

ROOS, W. P.; KAINA, B. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends in Molecular Medicine**, v. 12, p. 440-450, 2006.

ROSSETTO, R.; LIMVA-VERDE, I.B.; MATOS, M.H.T.; SARAIVA, M.V.A.; MARTINS, F.S.; FAUSTINO, L.R.; ARAÚJO, V.R.; SILVA, C.M.G.; NAME, K.P.O.; BÁO, S.N.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; BLUME, H. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 37, p.112–123, 2009.

SALES, J.N.S. Resposta superovulatória e qualidade de embriões de novilhas e vacas holandesas suplementadas com duas doses de  $\beta$ -caroteno associado ao tocoferol. **Tese** (Mestrado), UFL, Lavras, 2005.

SANTINI, S.E.; BASINI, G.; BUSSOLATI, S.; GRASSELLI, F. The phytoestrogen quercetin impairs steroidogenesis and angiogenesis in swine granulosa cells in vitro. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 1, p. 1-8, 2009.

SHIMADA, M.; TERADA, T. FSH and LH induce progesterone production and progesterone receptor synthesis in cumulus cells: a requirement for meiotic resumption in porcine oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v.8, p.612–618, 2002.

SHIRAZI, A.; SHAMS-ESFANDABADI, N.; HOSSEINI, S.M.; KARIMI, I. The presence of cumulus cells on nuclear maturation of sheep oocytes during in vitro maturation. **Small Ruminant Research**, v.68, p.291-295, 2007.

SILVA, A.A.A. Maturação *in vitro* de oócitos ovinos na presença de vitamina E. Petrolina-PE, 2015. 48p **Monografia** (Trabalho de Conclusão de Curso) - Campus Ciências Agrárias/Universidade Federal do Vale do São Francisco.

SILVA, C.M.G.; FAUSTINO, L.R.; SARAIVA, M.V.A.; ROSSETO, R.; FIGUEIREDO, J.R. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de foliculos e embriões. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.34, p.233-242, 2010.

SILVA, E.C.B.; GUERRA, M.M.P. Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.107, p.143-149, 2012.

SILVA, L.F.M.C. Estudo sobre a redução do estresse oxidativo de equino a partir da adição de quercetina nos diluentes de refrigeração e congelação (**Tese de mestrado**) Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia- Botucatu, 2016.

SIMPLÍCIO, A.A.; FREITAS, V.J.F.; FONSECA, J.F. Biotécnicas da reprodução como técnicas de manejo reprodutivo em ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, p. 234-246, 2007.

SOUZA-FABJAN, J.M.G.; YANN, L.; DUFFARD, N.; CORBIN, E.; BATISTA, I.T.P.; FREITAS, V.J.F.; BECKERS, J.F.; MERMILLOD, P. Intrinsic quality of goat oocytes already found denuded at collection for in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.86, p. 1989-1998, 2016.

SUTTON, M.L.; GILCHRIST, R.B.; THOMPSON, J.G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v.139, p.1-12. 2010.

TAKAHASHI, M. SRD Innovative Technology Award 2011 Oxidative Stress and Redox Regulation on In Vitro Development of Mammalian Embryos. **Journal of Reproduction and Development**, v. 58, p. 1-9, 2012.

TANABE, M.; TAMURA, H.; TAKETANI, T.; OKADA, M.; LEE, L., TAMURA, I. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, p.35–41, 2015.

TANGHE, S.; VAN SOOM, A.; NAUWYNCK, H.; CORYN, M.K.A. Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, p.414-424, 2002.

TARAZONA, A.M.; RODRIGUEZ, J.I.; RESTREPO, L.F.; OLIVERA-ANGEL, M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, p.5-11, 2006.

TRALDI, A.S. Produção *in vitro* de embriões de ovinos: uma visão crítica do método e de seu resultado a campo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.301-306, 2009.

TVRD, E.; SIMOV, T.; KOV, A.; LIBOV, L.; LUK, N. Protective Effects of quercetin on selected oxidative biomarkers in bovine spermatozoa subjected to ferrous ascorbate. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, p.524–537, 2016.

VAN BLERKOM, J.; DAVIS, P.; ALEXANDER, S. Inner mitochondrial membrane potential ( $\Delta\psi$ ), cytoplasmic ATP content and free  $Ca^{2+}$  levels in metaphase II mouse oocytes. **Human Reproduction**, v.18, p.2429-2440, 2003.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. **Small Ruminant Research**, v.106, p.160-164, 2005.

VELEZ-PARDO, C.; MORALES, A.T.; DEL RIO, M.J.; OLIVERA-ANGEL, M. Endogenously generated hydrogen peroxide induces apoptosis via mitochondrial damage independent of NF-kappa B and p53 activation in bovine embryos. **Theriogenology**, v. 67, p. 1285-1296, 2007.

WANI, N.A.; WANI, G.M.; KHAN, M.Z.; SALAHUDIN, S. Effect of oocyte harvesting techniques on *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization in sheep. **Small Ruminant Research**, v.36, p.63-67, 2000.

WATSON, A.J.; DE SOUSA, P.; CAVENEY, A.; BARCROFT, L.C.; NATALE, D.; URQUHART, J.; WESTHUSIN, M.E. Impact of bovine oocyte maturation media on oocyte transcript levels, blastocyst development, cell number, and apoptosis. **Biology of Reproduction**, v.62, p.355-364, 2000.

WHITAKER, B.D.; KNIGH, J.W. Exogenous  $\gamma$ -glutamyl cycle compounds supplemented to *in vitro* maturation medium influence *in vitro* fertilization, culture and embryos parameters of porcine oocytes and embryos. **Theriogenology**, v.62, p.311-322, 2004.

YAMAUCHI, N., NAGAI, T. Male pronuclear formation in denuded porcine oocytes after *in vitro* maturation in the presence of cysteamine. **Biology of Reproduction**, v. 61, p. 828-833, 1999.



YIVGI-OHANA, N.; EIFER, M.; ADDADI, Y.; NEEMAN, M.; GROSS, A. Utilizing mitochondrial events as biomarkers for imaging apoptosis. **Cell Death Diseases**, v. 2, p.1-8, 2011.

YOKOO, M.; SATO, E. Cumulus–oocyte complex interactions during oocyte maturation. **International Review of Cytology**, v. 91 p.235–251, 2004.

YOON, J.D.; YUBYEOL, J.A.; LIAN, C.A.; SEON-UNG, H.A.; EUNHYE, K.A.; EUNSONG, L.B.; DAE, Y.K.; SANG-HWAN, H. Effects of coculture with cumulus-derived somatic cells on *in vitro* maturation of porcine oocytes. **Theriogenology**, v.83, p. 294-305, 2014.

YOU, J.L.J.; HYUN, S.H.; LEE, E. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves *in vitro* development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. **Theriogenology**, v 43, p.235–243, 2012.

ZARAZA, J.; OROPEZA, A.; VELAZQUEZ, M.A.; KORSAWE, K.; HERMANN, D.; CARNWATH, J.W.; NIEMANN, H. Developmental competence and mRNA expression of preimplantation *in vitro*-produced embryos from prepubertal and postpubertal cattle and their relationship with apoptosis after intraovarian administration of IGF-1. **Theriogenology**, v. 74, n. 1, p. 75-89, 2010.

ZHANG, J.; QIANG W.; CAI, J.; ZHAO, X.; MA, B. Effect of C-Type Natriuretic Peptide on Maturation and Developmental Competence of Goat Oocytes Matured *In Vitro*. **JOURNAL Plos one**, v.10, p.1-10, 2015.

ZIMMERMANN, K. C.; BONZON, C.; GREEN, D. R. The machinery of programmed cell death. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 92, p. 57-70, 2001.

ZRIBI, N.; CHAKROUN, N.F.; BEN ABDALLAH, F.; ELLEUCH, H.; SELLAMI, A.; GARGOURI, J.; REBAI, T.; FAKHFAKH, F.; KESKES, L.A. Effect of freezing-thawing process and quercetin on human sperm survival and DNA integrity. **Cryobiology**, v.65, p.326-331, 2012.

ZUELKE, K.A.; JEFFAY, S.C.; ZUCKER, R.M.; PERREAULT, S.D. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes,

and pre-implantation stage embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.64, p.106-112, 2003.

**V. ANEXOS**

**Artigo completo submetido ao periódico científico  
Theriogenology**

**QUERCETIN IMPROVES *IN VITRO* MATURATION OF GOAT OOCYTES**

**A.A.A. Silva, L.B.F. Figueiredo, J.D. Gonçalves, M.N.P. Silva, M.J.S. Silva,  
M.L.G. Loiola, B.D.M. Bastos, R.A. Oliveira, L.G.M. Ribeiro, R.S. Barberino,  
B.B. Gouveia, A.P.O. Monte, D.M. Nogueira, M.F. Cordeiro,  
M.H.T. Matos, E.S. Lopes Júnior**

1 QUERCETIN IMPROVES *IN VITRO* MATURATION OF GOAT OOCYTES

2  
3 A.A.A. Silva <sup>a</sup>, L.B.F. Figueiredo <sup>a</sup>, J.D. Gonçalves <sup>a</sup>, M.N.P. Silva <sup>a</sup>, M.J.S. Silva  
4 <sup>a</sup>, M.L.G. Loiola <sup>a</sup>, B.D.M. Bastos <sup>a</sup>, R.A. Oliveira <sup>a</sup>, L.G.M. Ribeiro <sup>a</sup>, R.S.  
5 Barberino <sup>b</sup>, B.B. Gouveia <sup>b</sup>, A.P.O. Monte <sup>b</sup>, D.M. Nogueira <sup>c</sup>, M.F. Cordeiro <sup>a</sup>,  
6 M.H.T. Matos <sup>b</sup>, E.S. Lopes Júnior <sup>a,\*</sup>

7  
8 <sup>a</sup> Laboratory of Physiology and Biotechnology of Animal Reproduction, Federal  
9 University of San Francisco Valley, Petrolina, Brazil. <sup>b</sup> Nucleus of Biotechnology  
10 Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of San Francisco  
11 Valley, Petrolina, Brazil. <sup>c</sup> Brazilian Agricultural Research Corporation, Embrapa  
12 Tropical Semiarid, Brazil.

13  
14 \*Correspondence should be addressed to:

15 Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Colegiado de  
16 Medicina Veterinária - Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução  
17 Animal. Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho -  
18 S/N, C1. CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil.

19 Corresponding author. Tel.: +558721014816; fax: +558721014845.

20 E-mail address: edilson.lopes@univasf.edu.br (E.S. Lopes Júnior).

21

**22 Abstract**

23 The aim of this study was to evaluate the effect of quercetin as alternative  
24 antioxidant to cysteamine on in vitro maturation. Goat ovaries were transported  
25 from local abattoir to laboratory in 0.9% saline solution, at 30°C, until three  
26 hours after slaughter. After oocyte collection, oocytes were evaluated and  
27 submitted to in vitro maturation (IVM). Oocytes were allocated into three groups:  
28 CIS group, with oocytes matured in TCM-199 supplemented with EGF (10  
29  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), FSH/LH (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ), estrus serum sheep (100  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ) and cysteamine  
30 (10  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ); Q4 and Q8 groups, with oocytes matured at medium used in CIS  
31 group but without cysteamine and supplemented with 4  $\mu\text{M}$  or 8  $\mu\text{M}$  of  
32 quercetin, respectively. IVM of oocytes was performed at 38.5°C in humidified  
33 atmosphere of 5%  $\text{CO}_2$  in air for 24 hours. The data expressed as percentage  
34 were analyzed using Chi-square test. Means were compared by Student  
35 Newman Keuls test. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ . CIS  
36 and Q4 groups presented the same percentage of expanded cumulus cells but  
37 Q8 group was significantly lower than additional groups ( $P < 0.05$ ). Oocyte  
38 retraction rate at Q8 group was higher ( $P < 0.05$ ) than additional treatments.  
39 Concerning cumulus cells expansion, the treatment using 8  $\mu\text{M}$  of quercetin  
40 presented lower proportion of expanded oocytes with grade 1 (Total) than  
41 additional treatments ( $P < 0.05$ ). Percentage of oocytes MII was higher at Q4  
42 group than CIS group ( $P < 0.05$ ) but CIS and Q8 groups were similar. Apoptosis  
43 rate was higher at CIS group than additional groups ( $P < 0.05$ ). Oocytes from  
44 CIS and Q4 groups presented the same ROS and GSH levels. Furthermore,  
45 oocytes matured with 4  $\mu\text{M}$  of quercetin presented higher mitochondrial activity  
46 than oocytes matured at CIS and Q8 groups ( $P < 0.05$ ). In conclusion, 4  $\mu\text{M}$  of

47 quercetin can be used as alternative to cysteamine on *in vitro* maturation of  
48 goat oocytes.

49

50 **Keywords:** Antioxidant. DNA fragmentation. Flavonoid. GSH. Mitochondria.  
51 Ovary.

52

### 53 **1. Introduction**

54 In vitro oocyte maturation rates are lower than in vivo oocyte maturation  
55 rates. A possible factor that justifies this reality is the excessive production of  
56 Reactive Oxygen Species (ROS) on in vitro maturation (IVM) of oocytes [1].  
57 High ROS production can block or delay the oocyte development and decrease  
58 the viability of these cells [3]. However, the equilibrium of ROS concentrations in  
59 ideal conditions has positive impact on in vitro embryo production (IVP)  
60 because it promotes oocyte and embryo competency from energy generation  
61 during metabolism [2].

62 Inhibitory substances of ROS i.e. antioxidants have been considered  
63 significant components to supplement IVM medium such as cysteamine [4],  
64 cysteine [5] and vitamin E [6]. However, these substances have raised the cost  
65 of IVM medium although they present satisfactory results. Therefore, addition of  
66 alternative substances with antioxidant action that reduce the cost of maturation  
67 medium is necessary to improvement of IVM oocytes.

68 Quercetin (3,5,7,3'-4'-pentahydroxyflavone) is a natural flavonoid widely  
69 found in vegetables, grains, fruits, flowers, teas. It has therapeutics properties  
70 and antioxidant potential [7]. Positive effect of quercetin was already observed  
71 on IVM of bovine [2] and porcine [8] oocytes. Presence of quercetin promoted

72 excellent oocyte maturation rates and blastocyst development in swine by  
73 reduction of ROS intracellular levels [8]. Furthermore, quercetin reduces the  
74 cost of IVM of oocytes because this flavonoid is 3.6 times lower than  
75 conventional antioxidant cysteamine. However, there are no reports concerning  
76 effect of quercetin inclusion on IVM of oocytes in goats.

77 Therefore, the aim of the present study was to evaluate the effect of two  
78 quercetin concentrations (4  $\mu$ M and 8  $\mu$ M) as alternative oxidant to cysteamine  
79 on in vitro maturation of goat oocytes.

80

## 81 **2. Materials and Methods**

82

### 83 *2.1. Chemicals*

84 Chemicals used in this study were purchased from Sigma (Sigma-Aldrich  
85 Corp., St. Louis, MO, USA) or from another company specified in the text.

86

### 87 *2.2. Aspiration of oocytes*

88 Goat oocytes (n = 88) were collected from a local slaughterhouse and  
89 transported to the laboratory within 3 hours after collection in a termos bottle  
90 (Onix<sup>®</sup>, Soprano, Brazil) containing saline solution (NaCl 0,9%, Fresenius<sup>®</sup>,  
91 Dismed, Brazil) at 30°C according to Souza-Fabjan et al. (2016) [9]. Ovaries  
92 were washed in prewarmed three times in fresh saline (30°C) and maintained in  
93 water bath (MODEL 1102<sup>®</sup>, Fanem, Brazil) at 30°C. Oocytes were aspirated  
94 from all visible follicles between 2 and 6 mm in diameter with a 18-gauge short  
95 bevel needle (SOLIDOR<sup>®</sup>, Lamedid Comercial & Serviços, Brazil) connected to  
96 a Falcon tube under controlled vacuum (30 mmHg or 6-8 mL/min). The

97 collection tube was previously filled with 3 to 5 mL of tissue culture medium 199  
98 (TCM 199) supplemented with 50 IU/mL heparin, 50 µg/mL gentamycin and  
99 10% (v/v) of fetal calve serum (FCS).

100

### 101 2.3. Evaluation of oocytes

102 After collection, cumulus oocyte complexus (COCs) were transferred to 60  
103 mm petri dishes (Petri Dish60<sup>®</sup>, Nutricell, Brazil), analyzed under a stereo zoom  
104 microscope (SMZ 645<sup>®</sup>, Nikon, Japan) and classified into different grades  
105 according Avelar et al. (2012) [10]. Only COCs classified as Grade I (with more  
106 than three layers of cumulus compact cells) and Grade II (with one to three  
107 layers of cumulus cells finely granulated) were indicated to *in vitro* maturation.

108

### 109 2.4. IVM of oocytes and experimental design

110 Selected oocytes (n = 426) were washed in collection medium until  
111 maturation moment. After this, these oocytes were randomly allocated into three  
112 maturation groups: CIS group, with oocytes matured in TCM-199 supplemented  
113 with EGF (10 µL/mL), FSH/LH (10 µL/mL), estrus serum sheep (100 µL/mL)  
114 and cysteamine (10 µL/mL); Q4 and Q8 groups, with oocytes matured at  
115 medium used in CIS group but without cysteamine and supplemented with 4 µM  
116 or 8 µM of quercetin, respectively. The COCs were transferred to 5-well petri  
117 dishes (Thermo Scientific<sup>®</sup>, Nutricell, Brazil) containing 50 oocytes in 500 µL of  
118 maturation medium, under mineral oil, for 24 hours at 38,5°C, in a humidified  
119 atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air.

120

### 121 2.5. In vitro maturation evaluation (IVM)



### 122 2.5.1. Morphological evaluation

123 In order to evaluate the expansion of cumulus cells, matured oocytes were  
124 evaluated under a stereo zoom microscope (SMZ 645<sup>®</sup>, Nikon, Japan)  
125 considering presence or absence of cumulus cells expansion, according  
126 methodology of Avelar et al. (2012) [10]. In addition, the grade of cumulus cells  
127 expansion was evaluated and classified as Total (Grade I), Moderate (Grade II)  
128 and Light (Grade III), according Aghaz et al. (2015) [11].

129

### 130 2.5.2. Evaluation of chromatin configuration and oocyte DNA fragmentation

131 At the end of maturation, oocytes were submitted to TUNEL assay  
132 according Gouveia et al. (2016) [12]. Briefly, oocytes were denuded and fixed in  
133 4% paraformaldehyde solution for 1 hour at room temperature. Then, oocytes  
134 (approximately 10 oocytes per treatment group) were washed three times in  
135 solution of PBS/polyvinylpyrrolidone (PVP) and stored at 4°C in eppendorf  
136 (Tubo Eppendorf 1,5<sup>®</sup>, Eppendorf do Brasil, Brazil) with 400 µL of PBS/PVP, in  
137 freezer (Freezer Horizontal H400<sup>®</sup>, Electrolux, Sweden), until the beginning of  
138 TUNEL procedure. Therefore, oocytes were incubated in droplets of 100 µL of  
139 permeabilizing solution (0.1% [v:v] Triton X-100 in 10 mM PBS) for 3 hours at  
140 room temperature. Positive and negative controls were incubated in drops of  
141 100 µL containing DNase free RNase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA,  
142 USA) at room temperature for 1 hour and washed three times in drops of  
143 PBS/PVP. The TUNEL assay was prepared for 15 minutes as indicated by the  
144 manufacturer at 4°C (In Situ Cell Detection Kit, Fluorescein: Boehringer  
145 Mannheim/Roche Diagnostics Ltd., Indianapolis, USA). To this end, 112.5 µL  
146 terminal deoxynucleotidyl transferase enzyme and 112.5 µL of marker solution

147 of 2-deoxyuridine triphosphate 5-FITC were made to obtain 125  $\mu$ L of TUNEL  
148 mixture for reaction. The experimental groups and the positive control were  
149 incubated with 15  $\mu$ L of this solution for 1 hour at 37°C in a moist chamber  
150 (Equilam<sup>®</sup>, KEQ300UM, Brazil) in the dark. The negative control was incubated  
151 with 15  $\mu$ L of the marker solution. Oocytes were washed three times in drops of  
152 50  $\mu$ L of PBS/PVP and incubated in drops of 50  $\mu$ L of PBS containing 10 mM  
153 Hoechst 33342 for 15 minutes at room temperature in the dark. Then, oocytes  
154 were washed three times in drops of 50  $\mu$ L of PBS/PVP and slides (Coleman<sup>®</sup>,  
155 Roster, Brazil) were prepared for evaluation using an epifluorescence  
156 microscope (Nikon E200<sup>®</sup>, Tokyo, Japan) at a magnification of x 400. Oocytes  
157 were considered apoptotic when they have marked chromatin green  
158 fluorescence. After this, oocytes were submitted to chromatin evaluation and  
159 the different meiosis stages: Germinal vesicle (GV), Germinal vesicle  
160 breakdown (GVBD), Metaphasis I (MI) and Metaphasis II (MII), according  
161 methodology of Rajabi et al. (2013) [13].

162

### 163 *2.5.3. Assessment of oxidative stress markers (ROS and GSH intracellular* 164 *levels) and metabolically active mitochondria*

165 After IVM, 10 matured oocytes from each experimental group were  
166 denuded and intracellular reduced glutathione (GSH) and ROS levels and  
167 mitochondrial activity were measured as previously described Lins et al. (2016)  
168 [14], with minor modifications. Briefly, 4-chloromethyl-6.8-difluoro-7-  
169 hydroxycoumarin (CellTracker<sup>®</sup> Blue; CMF2HC; Invitrogen Corporation), 2', 7'-  
170 dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCFDA; Invitrogen Corporation) and  
171 MitoTracker Red (MitoTracker<sup>®</sup> Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne,

172 Victoria, Australia) were used to detect intracellular GSH, ROS and  
173 mitochondrial activity levels as blue, green and red fluorescence, respectively.  
174 Oocytes (approximately 10 oocytes per treatment group) were incubated in the  
175 dark for 30 minutes in PBS supplemented with 10 mM of CellTracker<sup>®</sup> Blue, 10  
176 mM of H2DCFDA and 100 nM MitoTracker<sup>®</sup> Red at 39°C. After incubation, the  
177 oocytes were washed with PBS and the fluorescence was observed under an  
178 epifluorescence microscope with UV filters (370 nm for GSH, 460 nm for ROS  
179 and 579-599 nm for active mitochondria). Fluorescence intensities of oocytes  
180 were analyzed using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda,  
181 MD, USA).

## 182 *2.6. Statistical analysis*

183 The data of maturation rate, cumulus cell expansion and retraction rates,  
184 different grades of cumulus cell expansion rates and percentage of DNA  
185 fragmentation were expressed as percentages and compared using Chi-Square  
186 test and software Epi Info (Epi Info 7.1.5.0, Atlanta, GA, USA, 2015). Data from  
187 GSH levels, mitochondrial activity were submitted to the Shapiro–Wilk test to  
188 verify normal distribution of residues and homogeneity of variances. Then,  
189 Kruskal–Wallis nonparametric test was used for comparisons. When main  
190 effects or interactions were significant, means were compared by test Student  
191 Newman Keuls. Data from apoptotic cells (TUNEL) were submitted to least  
192 significant difference Fisher test and expressed as percentage. The results  
193 were expressed as the means  $\pm$  standard error of the mean, and differences  
194 were considered significant when  $P < 0.05$ .

195

## 196 **3. Results**

197

198 *3.1. Morphological evaluation after IVM*

199 CIS group (control; Fig. 1A) presented the same percentage of expanded  
200 cumulus cells than Q4 group (Fig. 1B) (Table 1;  $P > 0.05$ ) but Q8 group was  
201 lower ( $P < 0.05$ ) than the additional treatments (Fig. 1C). After 24 hours from  
202 maturation onset, oocyte retraction rate at medium containing 8  $\mu\text{M}$  of quercetin  
203 was superior ( $P < 0.001$ ) than the other treatments (Table 1).

204 Concerning grades of cumulus cells expansion, the treatment containing 8  
205  $\mu\text{M}$  of quercetin presented lower proportion of expanded oocytes with Grade I  
206 (Total) and higher percentage of expanded oocytes with Grade III (Ligth) than  
207 treatments containing cysteamine and 4  $\mu\text{M}$  of quercetin ( $P < 0.05$ ) (Table 2).

208 *3.2. Analysis of chromatin configuration and DNA fragmentation*

209 Concerning nuclear maturation rate, percentage of oocytes that reached  
210 metaphase II stage was higher in the medium supplemented with 4  $\mu\text{M}$  of  
211 quercetin than medium containing cysteamine ( $P < 0.05$ ) but there was no  
212 significant difference between CIS and Q8 (Table 3; Fig. 2). Concerning  
213 percentage of oocytes presenting DNA fragmentation, there was a significant  
214 increasing ( $P < 0.05$ ) of TUNEL-positive cells at CIS group (28.2%) than Q4  
215 (0%) or Q8 (0%) group (Fig. 2).

216

217 *3.2. Quantification of reactive oxygen species levels (ROS), glutathione levels*  
218 *(GSH) and mitochondrial activity*

219 Concerning emission of quantified fluorescence by number of pixels,  
220 oocyte intracelular levels of ROS, GSH and mitochondrial activity are presented  
221 at Figures 3 and 4. Oocytes treated with 8  $\mu\text{M}$  of quercetin presented lower ( $P <$

222 0.05) ROS and GSH levels than female gametes matured at CIS and Q4  
223 groups but there was no significant difference between CIS and Q4 groups ( $P >$   
224 0.05). Oocytes matured on the presence of 4  $\mu\text{M}$  of quercetin (Q4) presented  
225 higher ( $P < 0.05$ ) mitochondrial activity than female gametes treated at CIS and  
226 Q8 groups. Moreover, oocytes matured at Q8 group presented lower ( $P < 0.05$ )  
227 mitochondrial activity than female gametes treated at CIS and Q4 groups.

228

#### 229 **4. Discussion**

230 This study is the first to report the effects of inclusion of quercetin as  
231 alternative to cysteamine on *in vitro* maturation of goat oocytes. IVM means  
232 supplemented with 4  $\mu\text{M}$  of quercetin (Q4) or 100  $\mu\text{M}$  of cysteamine (CIS)  
233 presented similar expanded cumulus cells and oocyte retraction rates (they did  
234 not promote cell damages). Our results are similar to reports of Orlovschi et al.  
235 (2013) [8] that observed excellent cumulus cells expansion rates in porcine  
236 oocytes matured at medium containing 25  $\mu\text{g/mL}$  of quercetin. These results  
237 suggest that supplementing with 4  $\mu\text{M}$  of quercetin or 100  $\mu\text{M}$  of cysteamine  
238 can influence the mucification process and quality of oocyte.

239 In contrast, supplementing with 8  $\mu\text{M}$  of quercetin at IVM medium  
240 promoted a lower cumulus cells expansion rate and a higher percentage of  
241 oocyte retraction than other treatments. A possible explanation is that the  
242 molecular structure of this flavonoid is similar to structure of estrogens and thus  
243 it probably interacts with estrogen receptors as well as a phytoestrogen.  
244 Therefore, quercetin would modulate the oocyte activity [8] promoting the  
245 decrease of synthesis and release of  $17\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) as well as synthesis of  
246 growth factors from granulosa cells [15]. This flavonoid thus affects the cellular

247 environment reducing the expansion potential of cumulus cells since E<sub>2</sub> has a  
248 significant function to the mucification of intrafollicular cells [16].

249 We observed at present study a higher percentage of oocytes that  
250 reached metaphase II stage at Q4 group than female gametes matured at  
251 control group (CIS). In contrast, Guemra et al. (2013) [2] verified no significant  
252 difference at proportion of bovine oocytes that reached metaphase II stage after  
253 IVM on presence of quercetin or cysteamine. It is important to emphasize that  
254 the nuclear maturation does not depend directly on cumulus cells expansion  
255 [17] as well as it was previously verified in cattle [18] and goat [19].

256 Although quercetin does not act directly on nuclear or cytoplasmic  
257 maturation [3], the maturation rate observed at medium containing 4 µM of  
258 quercetin can be explained by higher mitochondrial activity and lower DNA  
259 fragmentation observed at oocytes from Q4 group than female gametes  
260 matured with cysteamine (CIS group). Mitochondrial activity is considered an  
261 excellent marker of oocyte quality and viability. Since active, mitochondria  
262 ensure functional competence of oocytes mainly during cytoplasmic and nuclear  
263 maturation [20]. Mitochondrial activity on nuclear and cytoplasmic maturation is  
264 higher at mature oocytes [21]. In addition, mitochondrias have a significant  
265 function on programmed cellular death which starts with intracellular and  
266 extracellular signals propagated by mitochondrial way promoting mitochondrial  
267 disorder and cellular death [22].

268 Corroborating our results, Jia et al. (2011) [23] evaluated the effect of  
269 inclusion of quercetin on the culture of chicken follicles submitted to cytotoxicity  
270 with cadmium. They observed that the inclusion of quercetin at culture medium  
271 reduced the number of apoptosis cells. The antioxidant potential of quercetin

272 protects successfully the cell from possible damages and it ensures  
273 consequently a lower incidence of apoptosis [23]. Therefore, we suggest that  
274 the higher maturation rate after supplementing with 4  $\mu\text{M}$  of quercetin can be  
275 associated to higher oocyte quality conferring to female gamete higher  
276 competence to restart the meiosis [24].

277 Positive effects of quercetin and cysteamine during *in vitro* maturation and  
278 culture of oocytes are assigned to antioxidant potential of these substances. In  
279 adequate concentrations, these antioxidants mediate the equilibrium of ROS  
280 production resulting in cells with more quality and viability [8]. However, there  
281 was no significant difference ( $P > 0.05$ ) between CIS and Q4 groups concerning  
282 intracellular ROS and GSH levels. In contrast, Guemra et al. (2013) [2] found  
283 lower GSH levels at oocytes matured on presence of quercetin (2 e 10  $\mu\text{M}$ ).  
284 Quercetin equilibrates ROS production because it interacts with superoxide  
285 ions, chelate iron ions and it reduces lipid peroxidation, reducing cellular  
286 damages associated to oxidative stress [25]. However, quercetin can increase  
287 or decrease GSH levels according to concentration used. In addition, oocytes  
288 have endogenous GSH which it is found during maturation and metaphase II  
289 stage. Concentrations of quercetin can be changed according to *in vitro* cellular  
290 culture system adopted in laboratory [26].

291 Quercetin (8  $\mu\text{M}$ ) reduced ROS, GSH and mitochondrial activity levels.  
292 Similar results were observed at bovine [27] and human [28] sperms diluted in  
293 semen extensor on the presence of quercetin. High concentrations of quercetin  
294 reduce the modulatory activity of  $\text{Ca}^{+2}$ -ATPase resulting higher influx of  
295 intracellular calcium, cellular damages, mitochondrial disorder, reduction of  
296 mitochondrial activity and lower production of ROS by mitochondria [27,28].

297 In conclusion, 4  $\mu$ M of quercetin can be used as alternative to cysteamine  
298 on *in vitro* maturation of goat oocytes. However, more studies are necessary in  
299 order to find an ideal concentration of quercetin on *in vitro* maturation of goat  
300 oocytes and consequent *in vitro* fertilization and *in vitro* embryo production.

301

### 302 **Acknowledgements**

303 A.A.A. Silva was supported by CAPES and Federal University of San  
304 Francisco Valley. The authors wish to thank FACEPE because the financial  
305 support associated to project "Effect of inclusion of quercetin and pentoxifylline  
306 on *in vitro* production of goat embryos at semiarid of Northeastern Brazil"  
307 (APQ10635.05/15).

308

### 309 **References**

310 [1] Silva CMG, Faustino LR, Saraiva MVA, Rosseto R, Figueiredo JR. Influence  
311 of oxygen tension on *in vitro* oocyte maturation and follicular and embryo  
312 culture. Rev Bras Reprod Anim 2010; 34: 233-42.

313 [2] Guemra S, Monzani PS, Santos ES, Zanin, R, Ohashi OM, Miranda MS,  
314 Adona PS. *In vitro* maturation of bovine oocytes at medium supplemented with  
315 quercetin and its effect on embryo development. Arq Bras Med Vet Zoot 2013;  
316 65: 1616-24.

317 [3] Kang JT, Kwon DK, Park SJ, Kim SJ, Moon JH, Koo OJ, Jang G, Lee BC.  
318 Quercetin improves the *in vitro* development of porcine oocytes by decreasing  
319 reactive oxygen species levels. J Vet Sci 2013; 14:15-20.

320 [4] Mudo GAM, Silva HAL, Ribeiro LG, Medina FT, Cordeiro MF, Lopes Júnior  
321 ES. Ovarian follicular response after different treatments of ovarian stimulation



322 of prepubertal goats. XXV Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2015  
323 FORTALEZA, 2015.

324 [5] Pu Y, Wang Z, Bian Y, Zhang F, Yang P, Li Y, Zhang Y, Fang F, Cao H,  
325 Zhang X. All-*trans* retinoic acid improves goat oocyte nuclear maturation and  
326 reduces apoptotic cumulus cells during *in vitro* maturation. Anim Sci J 2014;  
327 85:833–39.

328 [6] Silva AAA. *In vitro* maturation of ovine oocytes on presence of vitamin E.  
329 Petrolina-PE, 2015. 48p Monography (Work of Conclusion of Course) - Campus  
330 Agricultural Sciences/ Federal University of San Francisco Valley.

331 [7] Behling EB, Senadao MC, Francescato HDC, Antunes LMG, Bianchi MLP.  
332 Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. Alim Nut 2004; 15:  
333 285-92.

334 [8] Orlovschi D, Miclea I, Zahan M. Quercetin efficacy on *in vitro* maturation of  
335 porcine oocytes. Anim Sci Biot 2014; 1: 47-51.

336 [9] Souza-Fabjan JMG, Yann L, Duffard N, Corbin E, Batista ITP, Freitas VJF,  
337 Beckers JF, Mermillod P. Intrinsic quality of goat oocytes already found  
338 denuded at collection for *in vitro* embryo production. Theriogenology 2016; 86:  
339 1989-98.

340 [10] Avelar SRG, Moura RR, Sousa FC, Pereira AF, Almeida KC, Melo CHS,  
341 Teles-Filho ACA, Baril G, Melo LM, Teixeira DIA, Freitas VJF. Oocyte  
342 production and *in vitro* maturation in Canindé goats following hormonal ovarian  
343 stimulation. Anim Reprod 2012; 9:27-32.

344 [11] Aghaz FH, Hajarian H, Shabankareh K, Abdolmohammadi A. Effect of  
345 sericin supplementation in maturation medium on cumulus cell expansion,

- 346 oocyte nuclear maturation, and subsequent embryo development in Sanjabi  
347 ewes during the breeding season. *Theriogenology* 2015; 84:1631–35.
- 348 [12] Gouveia BB, Macedo TJS, Santos JMS, Barberino RS, Menezes VG,  
349 Müller MC, Almeida JRGS, Figueiredo JR, Matos MHT. Supplemented base  
350 medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves *in vitro*  
351 development of isolated goat preantral follicles. *Theriogenology* 2016; 86:  
352 1275–84.
- 353 [13] Rajabi RT, Motamedi-Mo RJD, Mohamma, E. Roostael A, Reihaneh M.  
354 Effect of *Papaver rhoeas* L. extract on *in vitro* maturation of sheep oocytes.  
355 *Sma Rum Res* 2013; 114:146–151.
- 356 [14] Lins TLBG, Cavalcante AYP, Santos JMS, Menezes VG, Barros VRP,  
357 Barberino RS, Bezerra MES, Macedo TJ, Matos MHT. Rutine can replace the  
358 use of three other antioxidants in the culture medium maintaining the viability of  
359 sheep isolate secondary follicles. *Theriogenology* 2016; 89: 263–270.
- 360 [15] Santini SE, Basini G, Bussolati S, Grasselli F. The phytoestrogen quercetin  
361 impairs steroidogenesis and angiogenesis in swine granulosa cells *in vitro*. *J*  
362 *Biomed Biotech* 2009; 1: 1-8.
- 363 [16] Kubo N, Ilse SC, Miyano T. Effect of estradiol-17 $\beta$  during *in vitro* growth  
364 culture on the growth, maturation, cumulus expansion and development of  
365 porcine oocytes from early antral follicles. *Anim Sci J* 2015; 86: 251–59.
- 366 [17] Crocomo LF, Marques Filho WC, Ulian CMV, Branchini NS, Silva DT,  
367 Ackermann CL, Landim-Alvarenga FC, Bicudo SD. Effect of oil overlay on  
368 inhibition potential of roscovitine in sheep cumulus-oocyte complexes. *Reprod*  
369 *Dom Anim* 2015; 50:410–16.

- 370 [18] Shirazi A, Bahirae A, Ahmadi EN, Heidari B, Borjian S. The effect of the  
371 duration of *in vitro* maturation (IVM) on parthenogenetic development of ovine  
372 oocytes. *Avicenna J Med Biotechnol* 2007; 1:181–91.
- 373 [19] Hand LG, Wu YH, Wang H, Tan J. Factors affecting the efficiency and  
374 reversibility of roscovitine (ROS) block on the meiotic resumption of goat  
375 oocytes. *Mol Reprod Dev* 2006; 73: 238–46.
- 376 [20] Moussa M. Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. *Anim*  
377 *Reprod Sci* 2015; 155: 11-27.
- 378 [21] Tarazona AM, Rodriguez J I, Restrepo LF, OLIVERA-ANGEL M.  
379 Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in  
380 embryos produced *in vitro*. *Reprod Dom Anim* 2006; 41: 5-11.
- 381 [22] Tanabe M, Tamura H, Taketani T, Okada M, Lee L., Tamura I. Melatonin  
382 protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei,  
383 mitochondria, and plasma membranes in mice. *Journal of Reproduction and*  
384 *Development* 2015; 61: 35–41.
- 385 [23] Jia Y, Lin J, Mi Y, Zhang C. Quercetin attenuates cadmium-induced  
386 oxidative damage and apoptosis in granulosa cells from chicken ovarian  
387 follicles. *Reproductive Toxicology* 2011; 31: 477–85.
- 388 [24] Crocomo LF, Marques FW, Sudano MJ, Paschoal DM, Alvarenga FCL,  
389 Bicudo SD. Effect of roscovitine and cycloheximide on ultrastructure of sheep  
390 oocytes. *Small Rumin Res* 2013; 109:156–62.
- 391 [25] Johnke D, De Graaf SP, Bathgate R. Quercetin reduces the *in vitro*  
392 production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during chilled storage of rabbit spermatozoa. *Anim Reprod*  
393 *Sci* 2014; 151:208-19.

394 [26] Liu S, Hou W, Yao P. Quercetin protects against ethanol-induced oxidative  
395 damage in rat primary hepatocytes. *Toxic In Vitro* 2010; 24:516- 22.

396 [27] Tvrd E, Simov T, Kov A, Libov L, Luk N. Protective Effects of Quercetin on  
397 Selected Oxidative Biomarkers in Bovine Spermatozoa Subjected to Ferrous  
398 Ascorbate. *Reprod Dom Anim* 2016; 51:524–37.

399 [28] Khanduja KL, Verma A, Bhardwaj A. Impairment of human sperm motility  
400 and viability by quercetin is independent of lipid peroxidation. *Andrologia* 2002;  
401 33: 277-81.

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419 **Figure captions**

420

421 **Figure 1.** Expanded goat oocytes matured *in vitro* at medium containing  
422 cysteamine (CIS group; A), 4  $\mu\text{M}$  (Q4 group; B) or 8  $\mu\text{M}$  (Q8 group; C) of  
423 quercetin (x 70 magnification).

424

425 **Figure 2.** Stained chromatin after TUNEL reaction. Germinal vesicle after  
426 treatment with 8  $\mu\text{M}$  of quercetin (A). Germinal vesicle breakdown treated with 4  
427  $\mu\text{M}$  of quercetin (B). MI oocyte treated with 100  $\mu\text{M}$  of cysteamine (C). MII  
428 oocyte after treatment with 4  $\mu\text{M}$  of quercetin (D). Absence of TUNEL staining at  
429 negative control (E) and Q4 group (H). Staining of fragmented DNA with TUNEL  
430 in positive control (F) and CIS group (G). White arrows indicate chromatin  
431 stained with Hoechst. Red arrows indicate chromatin stained with TUNEL.  
432 Scale bar: 75  $\mu\text{m}$ .

433

434 **Figure 3.** Intracellular levels of ROS, GSH and mitochondrial activity  
435 (pixel/oocyte) of oocytes matured under different concentrations of quercetin: 0  
436  $\mu\text{M}$  (CIS); 4  $\mu\text{M}$  (Q4) e 8  $\mu\text{M}$  (Q8). Different small letters among columns, within  
437 of each parameter, indicate significant difference ( $P < 0.05$ ). Epifluorescence  
438 photomicrograph of goat oocytes stained with Dichlorofluorescein (A, B, C),  
439 CellTracker Blue (D, E, F) and MitoTracker Red (G, H, I) representing  
440 intracellular levels of ROS, GSH and mitochondrial activity (pixel/oocyte)  
441 respectively of oocytes matured under different concentrations of quercetin: 0  
442  $\mu\text{M}$  (A, D, G); 4  $\mu\text{M}$  (B, E, H) e 8  $\mu\text{M}$  (C, F, I). Scale bar: 75  $\mu\text{m}$ .

443

444 **Table 1.** Cumulus cells expansion and oocyte retraction rates (%) in goat  
 445 cumulus oocyte complexes (COCs) matured *in vitro* at medium containing  
 446 cysteamine (CIS group; A), 4  $\mu$ M (Q4 group; B) or 8  $\mu$ M (Q8 group; C) of  
 447 quercetin.

Treatments	Cumulus cells	Oocyte retraction
	expansion rate (n)	rate (n)
CIS	67,6% (96/142) <sup>a</sup>	9,9% (14/142) <sup>b</sup>
Q4	71,8% (102/142) <sup>a</sup>	7,7% (11/142) <sup>b</sup>
Q8	46,5% (66/142) <sup>b</sup>	38,0% (54/142) <sup>a</sup>

448 <sup>a, b</sup> Within a column, values with different superscripts differ significantly (P <  
 449 0.05).

450

451

452 **Table 2.** Effect of inclusion of quercetin on grade of expansion of goat cumulus  
 453 oocyte complexes (COCs) matured *in vitro* at medium containing cysteamine  
 454 (CIS group; A), 4  $\mu$ M (Q4 group; B) or 8  $\mu$ M (Q8 group; C) of quercetin.

Treatments	Grades of expansion (%)			
	G1 - Total (n)	G2 – Moderate(n)	G3-Light(n)	G1+G2 (n)
CIS	46,9%(45) <sup>a</sup>	36,4%(35) <sup>a</sup>	16,7%(16) <sup>b</sup>	83,3%
Q4	53,9%(55) <sup>a</sup>	34,3%(35) <sup>a</sup>	11,8%(12) <sup>b</sup>	88,2%
Q8	24,2%(16) <sup>b</sup>	18,2%(12) <sup>b</sup>	57,6%(38) <sup>a</sup>	42,4%

455 <sup>a, b</sup> Within a column, values with different superscripts differ significantly (P <  
 456 0.05).

457 n: number of expanded oocytes.

458

459 **Table 3.** Stages of nuclear maturation of goat oocytes matured *in vitro* at  
 460 medium containing cysteamine (CIS group; A), 4  $\mu$ M (Q4 group; B) or 8  $\mu$ M (Q8  
 461 group; C) of quercetin.

Treatments	Stages of nuclear maturation, n (%)			
	GV	GVBD	MI	MII
CIS	0 (0)	4 (25,0)	8 (50,0)	4 (25,0) <sup>a</sup>
Q4	0 (0)	5 (23,8)	4 (19,1)	12 (57,1) <sup>b</sup>
Q8	2 (11,8)	2 (11,8)	5 (29,4)	8 (47,0) <sup>ab</sup>

462 <sup>a, b</sup> Within a column, values with different superscripts differ significantly (P <  
 463 0.05).