

## Efecto de la quercetina sobre la tasa de desarrollo y la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*

### Effect of quercetin on the rate of development and viability of bovine embryos produced *in vitro*

Diana Maturana<sup>1,3</sup>, Jorge Gómez O.<sup>1</sup>, Giovanni Restrepo B.<sup>2</sup>

#### RESUMEN

Las tasas de desarrollo y la calidad de los embriones bovinos producidos *in vitro* son menores que los producidos *in vivo*, debido al estrés oxidativo al que son sometidos durante su manipulación y las condiciones de cultivo. El objetivo de este estudio fue evaluar la producción, la celularidad y la vitalidad de los blastocistos bovinos producidos *in vitro* con diferentes concentraciones de quercetina. Un total de 2108 oocitos fueron madurados *in vitro* en medio 199 con 10% de SFB, 5.0 µg/ml de LH y 0.5 µg/ml de FSH. La fertilización se realizó en medio TALP con  $2 \times 10^6$  espermatozoides/ml. Los posibles cigotos fueron cultivados a 38.7 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio de cultivo SOF suplementado con seis concentraciones de quercetina (1, 5, 10, 15, 20, 50 µM) y como controles se utilizaron el medio SOF sin quercetina y suplementado con DMSO. Se determinaron las tasas de clivaje (día 2) y blastocistos (día 7), así como la celularidad y la viabilidad celular de los blastocistos. Se realizó un análisis de varianza y las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey. Los tratamientos con 1 y 5 µM de quercetina fueron superiores para la tasa de blastocistos ( $p < 0.05$ ). Se observó una reducción en la tasa de clivaje, la tasa de blastocistos y la viabilidad celular para 20 y 50 µM, y se encontró una disminución en la celularidad para 15 µM. La quercetina utilizada a bajas concentraciones durante el cultivo *in vitro* de embriones bovinos produce un incremento en la tasa de blastocistos, mientras que el uso de altas concentraciones de quercetina genera efectos deletéreos en los embriones bovinos.

**Palabras clave:** antioxidante; estrés oxidativo; fertilización *in vitro*; radical libre

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Facultad de Ciencias Agrarias, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Grupo de Investigación en Biotecnología Animal (GIBA), Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia

<sup>3</sup> E-mail: dmmatura@unal.edu.co

Recibido: 9 de noviembre de 2018

Aceptado para publicación: 5 de mayo de 2019

## ABSTRACT

The development rates and the quality of the bovine embryos produced *in vitro* are lower than those produced *in vivo*, due to the oxidative stress to which they are subjected during their manipulation and the culture conditions. The aim of this study was to evaluate the production, cellularity and vitality of bovine blastocysts produced *in vitro* with different concentrations of quercetin. A total of 2108 oocytes were matured *in vitro* in medium 199 with 10% FBS, 5.0 µg/ml LH and 0.5 µg/ml FSH. Fertilization was carried out in TALP medium with  $2 \times 10^6$  spermatozoa/ml. Potential zygotes were cultured at 38.7 °C with 5% CO<sub>2</sub> in SOF culture medium supplemented with six concentrations of quercetin (1, 5, 10, 15, 20, 50 µM) and as controls were used the SOF medium without quercetin and supplemented with DMSO. The rates of cleavage (day 2) and blastocysts (day 7) were determined, as well as the cellularity and cell viability of the blastocysts. An analysis of variance was performed, and the means of the treatments were compared with the Tukey test. Treatments with 1 and 5 µM of quercetin were higher for the blastocyst rate ( $p < 0.05$ ). A reduction in the cleavage rate, the blastocyst rate and cell viability were observed for 20 and 50 µM, and a decrease in cellularity for 15 µM was found. Quercetin used at low concentrations during the *in vitro* culture of bovine embryos produces an increase in the rate of blastocysts, while the use of high concentrations of quercetin generates deleterious effects in bovine embryos.

**Key words:** antioxidant; oxidative stress; *in vitro* fertilization; free radical

## INTRODUCCIÓN

La producción de embriones *in vitro* ha permitido numerosos avances en el mejoramiento genético de los bovinos, y ha sido ampliamente utilizada a nivel mundial con fines investigativos y comerciales. No obstante, entre el 50 y el 70% de los posibles cigotos detienen su desarrollo a los 5-7 días del cultivo *in vitro* (Zullo *et al.*, 2016). Las bajas tasas de desarrollo embrionario *in vitro* están asociadas a las subóptimas condiciones de los medios de cultivo, la manipulación excesiva, la concentración de oxígeno y la alta exposición a la luz, que generan un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) (Olson y Seidel, 2000; Machado *et al.*, 2011; Merton *et al.*, 2013).

El exceso de EROs conlleva a una condición de estrés oxidativo que puede conducir a daños en el ADN y a la peroxidación de los lípidos, lo cual afecta la viabilidad celular,

y podría inducir la muerte programada de las células (Guérin *et al.*, 2001). Por lo tanto, el desbalance de EROs en los cultivos de embriones *in vitro* está altamente relacionado con la baja calidad de los blastocistos producidos, que a su vez está directamente relacionado a los bajos porcentajes de preñez (Kuwayama y Leibo, 2008; Caamaño *et al.*, 2015; Zullo *et al.*, 2016).

La adición de moléculas antioxidantes en las diferentes etapas de la producción de embriones, han mostrado un incremento en las tasas de blastocistos; entre estas, la carnitina, el resveratrol y la quercetina (Rahim *et al.*, 2011; Guemra *et al.*, 2013; Salzano *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2016; Truong y Gardner, 2017).

La carnitina es un antioxidante que se ha suplementado durante la maduración *in vitro* (MIV) de los ovocitos bovinos, mejorando la maduración nuclear y desarrollo de los embriones, pero la molécula no presenta

ningún efecto benéfico cuando los embriones son vitrificados (Phongnimitr *et al.*, 2013). Por otro lado, el resveratrol es un flavonoide que aumenta las tasas de blastocistos cuando se suplementa durante la maduración *in vitro* de oocitos bovinos (Wang *et al.*, 2014; Torres *et al.*, 2016; Kordowitzki *et al.*, 2016; Sovernigo *et al.*, 2017), porcinos (Kwak *et al.*, 2012) y caprinos (Mukherjee *et al.*, 2014). Además, aumenta el desarrollo embrionario durante el cultivo *in vitro* de embriones (Lee *et al.*, 2010) y la criotolerancia de los blastocistos (Giaretta *et al.*, 2013). Así mismo, Salzano *et al.* (2014) encontraron que la concentración de 0.5  $\mu\text{M}$  aportó criotolerancia a los embriones, obteniendo mejores resultados en la sobrevivencia a la vitrificación. Sin embargo, las aplicaciones del uso del resveratrol podrían estar limitadas, ya que los precursores que se emplean para su obtención son costosos para aplicaciones industriales (Li *et al.*, 2015), de allí la importancia de evaluar otras moléculas que puedan tener efectos similares o superiores al resveratrol a un menor costo.

Otro flavonoide perteneciente al grupo de los polifenoles que ha sido estudiado es la quercetina. Se han demostrado su eficacia para atrapar radicales libres en cultivos celulares, inclusive siendo superior a los antioxidantes tradicionales como las vitaminas C y E (Gordon y Roedig-Penman, 1998; Ishige *et al.*, 2001; Geetha *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2010), y se le encuentra fácilmente en la naturaleza (Wang *et al.*, 2016). Se han reportado resultados positivos sobre las tasas de maduración y producción de blastocistos al suplementar la quercetina a bajas concentraciones en el medio de maduración en diferentes especies; así, Banihosseini *et al.* (2018) la utilizaron en concentración de 16 y 30  $\mu\text{M}$ , mejorando la maduración y el desarrollo de embriones murinos. Adicionalmente, Sovernigo *et al.* (2017) informaron que no hubo diferencia respecto a las tasas de clivaje de oocitos bovinos madurados en medios suplementados con quercetina, vitamina C, cisteamina, carnitina y resveratrol, ni para la eclosión de los blastocistos.

Se dispone de escasos reportes sobre el efecto de la quercetina en la producción *in vitro* de embriones bovinos. Sin embargo, se conoce que en la fase de maduración *in vitro* permite un incremento en la tasa de producción de blastocistos, al ser utilizada en concentraciones entre 2 y 10  $\mu\text{M}$  (Guemra *et al.*, 2013). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la quercetina sobre la tasa de desarrollo y la viabilidad de embriones bovinos producidos *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Obtención de Oocitos

Se recolectaron ovarios de hembras bovinas faenadas en el frigorífico de la Central Ganadera S.A de Medellín, Colombia, y transportados durante 30 minutos en solución salina estéril al 0.9% a 35 °C hasta el laboratorio del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, en la sede de Bello, Antioquía.

Los complejos cúmulus oocitos (COCs) fueron obtenidos mediante la aspiración de folículos con diámetros entre 2 y 6 mm, usando una jeringa de 5 ml y una aguja hipodérmica estéril calibre 18 (González *et al.*, 1992; Coelho *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2002; Calegari *et al.*, 2012). El líquido folicular fue depositado en tubos estériles de 50 ml, mantenidos en baño maría a 35 °C durante el proceso de aspiración. Los complejos COCs fueron recuperados mediante un filtro de 70  $\mu\text{m}$  (Falcon™, EEUU) y depositados en Solución Buffer Fosfato (PBS) para ser seleccionados y clasificados. Los COCs aptos para la maduración se evaluaron teniendo en cuenta tres parámetros: citoplasma homogéneo, morfología homogénea y mínimo tres capas de células de la granulosa (Leibfried y First, 1979).

### Maduración *in vitro* (MIV)

Los CCOs fueron incubados en gotas de 70  $\mu\text{l}$  de medio de maduración (Gibco 11150-059) suplementado con 0.33 mM de

piruvato de sodio (Sigma, EEUU), 1 µg/mL de estradiol (Sigma, EEUU), 10% de suero fetal bovino (SFB) (Sigma), 83.4 µg/ml de amikacina (Genfar®, Colombia), 50 UI/ml LH (Chorulon®), 1 µg/ml de FSH (Bioniche, Canadá). Las gotas fueron cubiertas con aceite mineral (Sigma) e incubadas a 38.7 °C, 5% de CO<sub>2</sub> en aire con 90% de humedad relativa por 24 horas (Guemra *et al.*, 2013).

### Fertilización *in vitro*

Para la fertilización *in vitro* (FIV) de los COCs previamente madurados se utilizó semen criopreservado de un donante de la raza Blanco Orejinegro. El semen fue descongelado en agua a 37 °C durante 1 minuto. Los espermatozoides móviles fueron seleccionados por un gradiente discontinuo de Percoll® 45% - 90% adicionando 250 µl en un tubo de 1.5 ml. El semen fue adicionado en la parte superior del gradiente de Percoll® (Sigma), el cual fue sometido a centrifugación a 800 g por 5 minutos (Eppendorf®, Alemania). El sobrenadante fue retirado y el pellet fue resuspendido en 400 µl de medio Fert-TALP y luego centrifugado por 3 minutos a 400 g (Parrish, 2014).

El medio de FIV fue suplementado con 2 µM de penicilamina (Sigma), 1 µM de hipotaurina (Sigma), 250 µM de epinefrina (Sigma), 20 µg/mL de heparina (Sigma) y 6 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma). Los gametos fueron incubados durante 18 horas en gotas de 60 µl de medio FIV cubiertas con aceite mineral (Sigma), con una concentración de 2x10<sup>6</sup> espermatozoides/ml (Guemra *et al.*, 2013).

### Cultivo *in vitro*

Pasadas las 18 horas de la fertilización, se retiraron las células del cúmulus por pipeteo y los posibles cigotos fueron transferidos al medio fluido sintético oviductal (SOF) (Holm *et al.*, 1999), el cual fue suplementado con 0.33 mM de piruvato de sodio (Sigma), 3% de aminoácidos esenciales (Sigma), 1% de no esenciales (Sigma), 0.34 mM de

tricitrato de sodio (Sigma), 2.7 mM de mioinositol (Sigma) (Holm *et al.*, 1999), 5% de SFB (Gibco, EE.UU), 5 mg/ml de BSA y quercetina (Sigma) diluida en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma) a diferentes concentraciones (1, 5, 10, 15, 20, 50 µM). Como controles se empleó el medio SOF sin antioxidante y SOF con DMSO a una relación 1 µl/ml, debido a que fue el solvente utilizado para diluir el antioxidante.

El cultivo se realizó en gotas de 70 µl cubiertas de aceite mineral. El medio fue mantenido en incubadora a 38.7 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Pasadas 48 horas se determinó el porcentaje de división y se realizó el recambio del 50% del medio de cultivo. En el día 6 de desarrollo se realizó un último recambio del 50% del medio de cultivo y en el día 7 se determinaron las tasas de producción de embriones.

### Viabilidad de los Embriones

Los blastocistos expandidos fueron transferidos durante 1 minuto a tubos de 0.6 ml que contenían medio SOF con pronasa (5 IU/ml) (Sigma) (Sifer *et al.*, 2006). Fueron transferidos a 50 µl de medio SOF que contenía 5 µg/ml de Hoechst 33258 (Sigma) se incubaron a 37 °C durante 8 minutos. Luego se adicionaron 5 µl de yoduro de propidio (Sigma) para una concentración final de 100 µg/ml y se incubó durante 8 minutos en condiciones de oscuridad. Posteriormente, se lavaron los embriones en 100 µl de medio SOF y se evaluaron mediante la visualización en el microscopio de epifluorescencia E200 con HBO (Nikon Eclipse, EEUU), mediante un filtro UV-2A para las longitudes de onda entre 495/617 nm. Se realizó registro fotográfico de cada embrión y posteriormente se realizó el conteo de células vivas (azules) y muertas (rojas).

### Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza, para el cual fueron evaluados previamente los supuestos de normalidad mediante la prueba

Shapiro-Wilk y la homogeneidad de las varianzas mediante la prueba de Levene. La comparación de las medias se realizó mediante la prueba de Tukey. Todos los análisis se realizaron a través del programa SIGMA STAT (Systat Software, USA), considerando como significativo un valor  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores encontrados para la producción de embriones bovinos *in vitro* (Cuadro 1) muestran un efecto de la quercetina dependiente de la concentración suplementada. Las dosis mayores afectaron las tasas de división y de blastocistos, aunque esto no se manifestó en el estadio de desarrollo de 4 o más células. Se ha reportado que las bajas dosis de quercetina (2-10  $\mu\text{M}$ ) están asociadas con la protección contra las lesiones oxidantes, mientras que las altas dosis tienen un efecto opuesto (Johnson y Loo, 2000; Kang *et al.*, 2013).

Aunque los flavonoides se caracterizan por presentar actividad antioxidante, bajo algunas circunstancias pueden formar un radi-

cal aroxilo o de un complejo flavonoide hierro redox, resultando en una autooxidación del radical aroxilo, el cual produce un anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y, este a su vez, genera el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ), que puede tener efectos mutagénicos y citotóxicos (Hodnick *et al.*, 1988; Hanasaki *et al.*, 1994) inducidos por las altas concentraciones (Laughton *et al.*, 1991; da Silva *et al.*, 2002). Cao *et al.* (1997) revelaron que la quercetina en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$  libres actúa como prooxidante. Esto fue evidente en los resultados del presente estudio y consistente con lo hallado por Yu *et al.* (2014), quienes encontraron que la quercetina a 50  $\mu\text{M}$  disminuyó significativamente el desarrollo embrionario, actuando como un prooxidante. Entre tanto, Yu *et al.* (2014) y Sameni *et al.* (2018) afirman que la quercetina promueve el desarrollo de los embriones de ratón cuando se trabaja a 5  $\mu\text{M}$ .

Cabe señalar que existen pocos reportes sobre el efecto de la quercetina en la producción *in vitro* de embriones bovinos; sin embargo, este antioxidante ha sido suplementado en la fase de maduración *in vitro* con éxito relativo (Gemra *et al.*, 2013; Sovernigo *et al.*, 2017). Así, Gemra *et al.* (2013) en-

Cuadro 1. Efecto de la quercetina sobre el cultivo de embriones bovinos producidos *in vitro*

Quercetina ( $\mu\text{M}$ )	COC (n)	Clivaje n (%)	>4 células - Día 3 n (%)	Blastocistos - Día 7 n (%)
1	255	219 (85.9 $\pm$ 0.09) <sup>a</sup>	182 (71.4 $\pm$ 0.12) <sup>a</sup>	105 (41.2 $\pm$ 0.10) <sup>ab</sup>
5	266	233 (87.6 $\pm$ 0.10) <sup>a</sup>	212 (79.7 $\pm$ 0.13) <sup>a</sup>	128 (48.1 $\pm$ 0.10) <sup>a</sup>
10	273	208 (76.2 $\pm$ 0.11) <sup>a</sup>	176 (64.5 $\pm$ 0.15) <sup>a</sup>	91 (33.3 $\pm$ 0.09) <sup>b</sup>
15	264	208 (78.8 $\pm$ 0.11) <sup>a</sup>	166 (62.9 $\pm$ 0.24) <sup>a</sup>	87 (33.0 $\pm$ 0.09) <sup>b</sup>
20	294	220 (74.8 $\pm$ 0.13) <sup>b</sup>	203 (69.0 $\pm$ 0.12) <sup>a</sup>	79 (26.9 $\pm$ 0.09) <sup>c</sup>
50	287	213 (74.2 $\pm$ 0.11) <sup>b</sup>	188 (65.5 $\pm$ 0.11) <sup>a</sup>	68 (23.7 $\pm$ 0.09) <sup>c</sup>
C1	244	204 (83.6 $\pm$ 0.06) <sup>a</sup>	178 (73.0 $\pm$ 0.08) <sup>a</sup>	92 (37.7 $\pm$ 0.07) <sup>b</sup>
C2	243	196 (80.7 $\pm$ 0.10) <sup>a</sup>	165 (67.9 $\pm$ 0.12) <sup>a</sup>	80 (32.9 $\pm$ 0.05) <sup>b</sup>

C1: tratamiento control con medio SOF y con 1  $\mu\text{l/ml}$  de DMSO; C2: Tratamiento control solo con medio SOF

Valores con diferentes superíndices (a-e) dentro de columnas denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

Cuadro 2. Celularidad de blastocistos bovinos producidos *in vitro* en diferentes concentraciones de quercetina (n = 30 blastocistos por tratamiento)

Quercetina ( $\mu\text{M}$ )	Células Totales
1	117.3 $\pm$ 20.3 <sup>a</sup>
5	133.5 $\pm$ 37.3 <sup>a</sup>
10	122.4 $\pm$ 27.0 <sup>a</sup>
15	111.2 $\pm$ 27.0 <sup>b</sup>
20	113.1 $\pm$ 30.4 <sup>a</sup>
50	113.5 $\pm$ 25.2 <sup>a</sup>
C1	129.6 $\pm$ 23.9 <sup>a</sup>
C2	124.5 $\pm$ 28.1 <sup>a</sup>

C1: tratamiento control con medio SOF y 1  $\mu\text{l/ml}$  de DMSO; C2: tratamiento control solo con medio SOF

Valores con diferentes superíndices denotan diferencias significativas ( $p < 0.05$ )

contraron que la suplementación de los medios de maduración con quercetina (2  $\mu\text{M}$ ) no mejoró las tasas de maduración nuclear ni de clivaje; mientras que Sovernigo *et al.* (2017) obtuvieron mayores tasas de producción de blastocistos y una reducción de EROs en los oocitos. La suplementación del medio de maduración con quercetina podría actuar como un mecanismo de defensa contra las EROs y podría contribuir a mantener el sistema glutatión (GSH) (Kovacic y Somanathan, 2010; Jeong y Joo, 2016). Sin embargo, no se ha reportado un incremento en los niveles de GSH utilizando quercetina en el medio de maduración (Gemra *et al.*, 2013; Sovernigo *et al.*, 2017). En cuanto al DMSO usado para disolver la quercetina, no se encontró un efecto significativo en las tasas de producción de blastocistos respecto al control con el medio SOF (Yu *et al.*, 2014; Banihosseini *et al.*, 2018).

Banihosseini *et al.* (2018) encontraron que las bajas concentraciones de quercetina en los medios de maduración *in vitro* aumentaron la formación de blastocistos de ratón;

de forma similar a lo reportado por Kang *et al.* (2013) en porcinos. Así mismo, Guemra *et al.* (2013), informaron un incremento en las tasas de desarrollo cuando los oocitos bovinos fueron cultivados en medios con presencia de quercetina a bajas concentraciones (2-10  $\mu\text{M}$ ), mientras que una alta concentración (50  $\mu\text{M}$ ) causó un efecto deletéreo. Lo anterior ha sido asociado a su efecto prooxidante o antioxidante, el cual es dependiente de la concentración (Yu *et al.*, 2014). Se ha reportado que las altas concentraciones de EROs pueden generar estrés oxidativo que resulta en la inducción de la apoptosis en varios tipos de células (Bayir *et al.*, 2008); sin embargo, los oocitos que son tratados con quercetina a bajas concentraciones presentan una reducción en los niveles de EROs (Banihosseini *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2017).

Kang *et al.* (2013) y Banihosseini *et al.* (2018) no hallaron diferencias en el número de células totales de los blastocistos porcinos producidos *in vitro* con quercetina, lo cual es similar a los resultados encontrados en esta investigación, donde solo se observó un efecto de la concentración de 15  $\mu\text{M}$  sobre la celularidad y no se observó dicho efecto a concentraciones superiores (20 y 50  $\mu\text{M}$ ) (Cuadro 2). Esto muestra que la quercetina es benéfica para la formación de blastocistos e interfiere poco en la celularidad de estos. A diferencia de este resultado, otros antioxidantes como el resveratrol (Lee *et al.*, 2010) y la melatonina (Liang *et al.*, 2017) han mostrado un efecto positivo sobre la celularidad.

Se ha demostrado que la quercetina puede inducir selectivamente la apoptosis en células cancerosas y evitarla en células normales (Liang *et al.*, 2011; Park y Min do, 2011). Esto se ha probado tanto en fetos (Wang *et al.*, 2016) como en blastocistos de ratón producidos *in vitro*, generando un mayor número de células viables (Yu *et al.*, 2014). Por su parte, Sameni *et al.* (2018) afirman que la quercetina promueve el desarrollo de los embriones de ratón y reduce la apoptosis en las blastómeras cuando se tra-

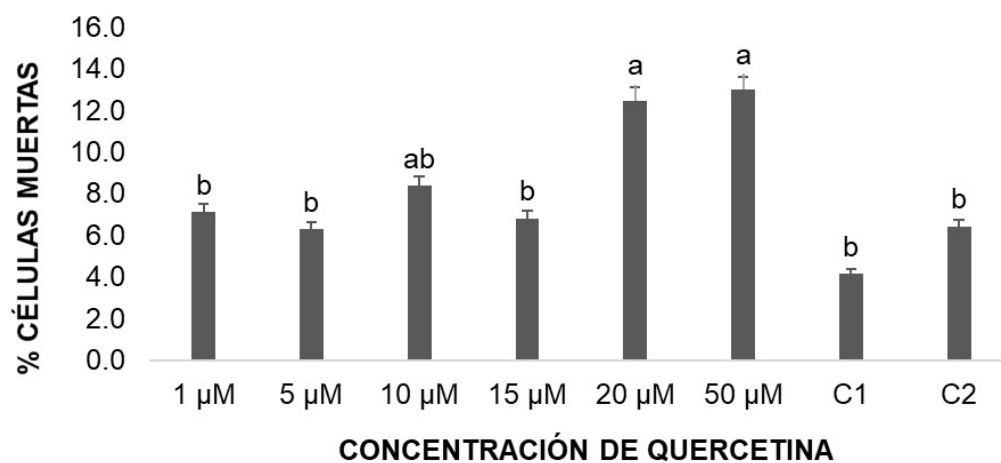


Figura 1. Viabilidad celular en blastocistos expandidos (día 7 de desarrollo). C1: tratamiento control con medio SOF y 1 µl/ml de DMSO; C2: tratamiento control solo con medio SOF (medias ± DE). Letras diferentes dentro de cada parámetro representan significancia estadística ( $p < 0.05$ )

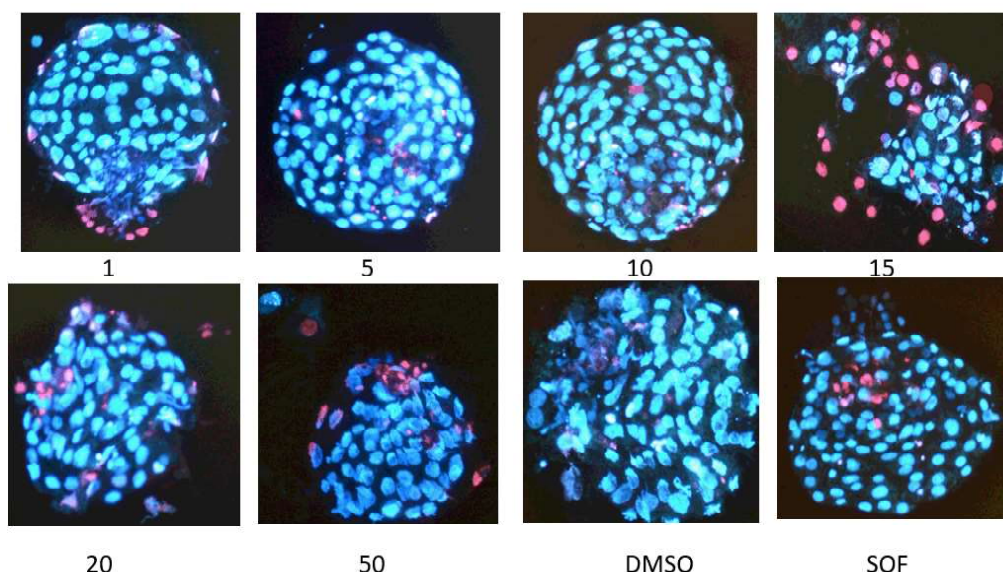


Figura 2. Células vivas y muertas de embriones bovinos producidos con diferentes concentraciones de quercetina

baja a 5  $\mu\text{M}$ . Lo anterior concuerda con los resultados del presente estudio, donde a bajas concentraciones no hay alteraciones en el número de células viables comparadas con el control, mientras que altas concentraciones resultan en un incremento de células muertas (Figuras 1 y 2), habiéndose sugerido que se debe a su efecto antioxidante (Heim *et al.*, 2002). El mecanismo antioxidante de la quercetina se debe a su estructura polifenólica que son bien conocidos por su capacidad de interactuar con las EROs y ERNs mediante la transferencia de electrones (SET) y la transferencia de un átomo de hidrogeno (HAT); en el primer caso se cede un electrón al radical y en el segundo, el antioxidante cede un átomo de hidrógeno que estabiliza el radical (Zapata *et al.*, 2014).

En el presente estudio se encontró que a altas concentraciones de quercetina se genera una reducción de la viabilidad celular en los blastocistos; a su vez, las bajas concentraciones no tienen efecto sobre la proporción de células muertas (Figura 1). En este sentido, otras investigaciones evidencian que la quercetina, al igual que otros antioxidantes, interfiere con la expresión de genes relacionados con la apoptosis y la calidad embrionaria (Bax, Bcl-2, TP53, Oct-4, Cx-43, IGF-1 y Glut-1 (Elamran *et al.*, 2012; You *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013; Mukherjee *et al.*, 2014; Kawashima *et al.*, 2015). Es oportuno recalcar que todos los experimentos corroboran los efectos benéficos sobre la producción y calidad de embriones al suplementar la quercetina a bajas concentraciones en la fase de cultivo *in vitro*. Por lo tanto, sería importante determinar si la suplementación de quercetina durante todo el proceso de producción de embriones *in vitro* generaría mejores resultados.

## CONCLUSIONES

- La suplementación del medio de cultivo con quercetina a 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  genera un incremento en la producción de embriones bovinos *in vitro*.

- El uso de bajas concentraciones de quercetina en la fase de cultivo no interfiere con la celularidad y la viabilidad celular de los blastocistos bovinos producidos *in vitro*.
- El uso de altas concentraciones de quercetina en la fase de cultivo genera efectos deletéreos sobre la producción *in vitro* de embriones bovinos.

## Agradecimientos

Al Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid y la Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín, por la financiación de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

1. **Banihosseini SZ, Novin MG, Nazarian H, Piryaei A, Parvardeh S, Eini F. 2018.** Quercetin improves developmental competence of mouse oocytes by reducing oxidative stress during *in vitro* maturation. *Ann Anim Sci* 18: 87-98. doi: 10.1515/aos-2017-0029
2. **Bayir H, Kagan VE. 2008.** Bench-to bedside review: mitochondrial injury, oxidative stress and apoptosis-there is nothing more practical than a good theory. *Crit Care* 12: 206. doi: 10.1186/cc6779
3. **Caamaño JN, Gómez E, Trigal B, Muñoz M, Carrocera S, Martín D, Díez C. 2015.** Survival of vitrified *in vitro*-produced bovine embryos after a one-step warming in-straw cryoprotectant dilution procedure. *Theriogenology* 83: 881-890. doi: 10.1016/j.theriogenology.2014.11.021
4. **Calegari RS, Crespilho AM, Martins A, Ferro AC. 2012.** Produção de embriões bovinos *in vitro* em meio de cultura com ácido ascórbico. *Vet Zootec* 16: 80-88.
5. **Cao G, Sofic E, Prior R. 1997.** Antioxidant and prooxidant behaviour of flavonoids: structure-activity relationships. *Free Radical Bio Med* 22: 749-760.



6. **Choi JY, Kang JT, Park SJ, Kim SJ, Moon JH, Saadeldin IM, Jang G, et al. 2013.** Effect of 7, 8-dihydroxyflavone as an antioxidant on *in vitro* maturation of oocytes and development of parthenogenetic embryos in pigs. *J Reprod Develop* 59: 450-456.
7. **Coelho L, Esper C, Herrera R, Vantini R, Almeida I. 2002.** Produção *in vitro* de embriões bovinos: utilização de diferentes fontes de gonadotrofinas na maturação dos oócitos. *Rev Bras Zootecn* 31: 1117-1121. doi: 10.1590/S1516-35982002000500007
8. **da Silva J, Herrmann SM, Peres W, Possa N, Gonzalez J, Erdtmann B. 2002.** Evaluation of the genotoxic effect of rutin and quercetin by comet assay and micronucleus test. *Food Chem Toxicol* 40: 941-947. doi: 10.1016/S0278-6915(02)00015-7
9. **Elamaran G, Singh K, Singh M, Singla S, Chauhan M, Manik R, Palta P. 2012.** Oxygen concentration and cysteamine supplementation during *in vitro* production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos affect mRNA expression of BCL-2, BCL-XL, MCL-1, BAX and BID. *Reprod Domest Anim* 47:1027-1036. doi: 10.1111/j.1439-0531.2012.02009.x
10. **Geetha T, Malhotra V, Chopra K, Kaur IP. 2005.** Antimutagenic and antioxidant/prooxidant activity of quercetin. *Indian J Exp Biol* 43: 61-67.
11. **Giaretta E, Spinaci M, Bucci D, Tamanini C, Galeati G. 2013.** Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. *Oxid Med Cell Longev*. doi: 10.1155/2013/920257
12. **González R, Soto E, Delgado N, Ondiz A, Velarde J. 1992.** Comparación de dos métodos de recolección de oocitos de ovarios de bovinos mestizos sacrificados. *Rev Cient-Fac Cien V* 11: 11-13.
13. **Gordon MH, Roedig-Penman A. 1998.** Antioxidant activity of quercetin and myricetin in liposomes. *Chem Phys Lipids* 97: 79-85. doi: 10.1016/S0009-3084(98)00098-X
14. **Guemra, S, Monzani, PS, Santos ES, Zanin R, Ohashi OM, Miranda MS, et al. 2013.** Maturação *in vitro* de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. *Arq Bras Med Vet Zoo* 65: 1616-1624. doi: 10.1590/S0102-09352013000600005
15. **Guérin P, El Mouatassim S, Ménézo Y. 2001.** Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Hum Reprod Update* 7: 175-189. doi: 10.1093/humupd/7.2.175
16. **Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. 1994.** The correlation between active oxygens scavenging y antioxidant effects of flavonoids. *Free Radical Bio Med* 16: 845-850. doi: 10.1016/0891-5849(94)-90202-X
17. **Heim KE, Tagliaferro AR, Bobilya DJ. 2002.** Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13: 572-584. doi: 10.1016/S0955-2863(02)-00208-5
18. **Hodnick WF, Milosavljeviæ EB, Nelson JH, Pardini RS. 1988.** Electrochemistry of flavonoids. *Biochem Pharmacol* 37: 2607-2611.
19. **Holm P, Booth PJ, Scsmidt MH Greve T, Callesen H. 1999.** High bovine blastocyst development in a static *in vitro* production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. *Theriogenology* 52: 683-700. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00162-4
20. **Ishige K, Schubert D, Sagara Y. 2001.** Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. *Free Radic Biol Med* 30: 433-446. doi: 10.1016/S0891-5849(00)-00498-6
21. **Jeong CH, Joo SH. 2016.** Downregulation of reactive oxygen species in apoptosis. *J Cancer Prev* 21: 13-20. doi: 10.15430/JCP.2016.21.1.13

22. **Johnson MK, Loo G 2000.** Effects of epigallocatechin gallate and quercetin on oxidative damage to cellular DNA. *Mutat Res* 459: 211-218. doi: 10.1016/S0921-8777(99)00074-9
23. **Kang JT, Kwon DK, Park SJ, Kim SJ, Moon JH, Koo OJ, Jang G, Lee BC. 2013.** Quercetin improves the *in vitro* development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. *J Vet Sci*. 14: 15-20. doi: 10.4142/jvs.2013.14.1.15
24. **Kang JT, Moon JH, Choi JY, Park SJ, Kim SJ, Saadeldin IM, Lee BC. 2016.** Effect of antioxidant flavonoids (quercetin and taxifolin) on *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Asian Austral J Anim* 29: 352-358. doi: 10.5713/ajas.15.0341
25. **Kawashima A, Sekizawa A, Koide K, Hasegawa J, Satoh K, Arakaki T, Takenaka S, et al. 2015.** Vitamin C induces the reduction of oxidative stress and paradoxically stimulates the apoptotic gene expression in extravillous trophoblasts derived from first-trimester tissue. *Reprod Sci* 22: 783-790. doi: 10.1177/1933719114561561
26. **Kordowitzki P, Bernal SM, Herrmann D, Aldag P, Niemann H. 2016.** Resveratrol supplementation during *in vitro* maturation and fertilisation enhances developmental competence of bovine oocytes. *Reprod Fert Develop* 28: 230-230. doi: 10.1071/RDv28n2Ab198
27. **Kovacic P, Somanathan, R. 2010.** Multifaceted approach to resveratrol bioactivity: focus on antioxidant action, cell signaling and safety. *Oxid Med Cell Longev* 3: 86-100. doi: 10.4161/oxim.3.2.11147
28. **Kuwayama M, Leibo SP. 2008.** Efficiency of the cryotop method to cryopreserve human oocytes analysis of *in vitro* and *in vivo* results at eleven IVF clinics. *Int J Fertil Steril* 90: 281-282. doi: 10.1016/j.fertnstert.2008.07.1089
29. **Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH. 2012.** The effects of resveratrol on porcine oocyte *in vitro* maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 78: 86-101. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.01.024
30. **Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Hoult JR, Halliwell B. 1991.** Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. Relationship to antioxidant activity and to iron ion-reducing ability. *Biochem Pharmacol* 42: 1673-1681. doi: 10.1016/0006-2952(91)90501-U
31. **Lee K, Wang C, Chaille J, Machaty Z. 2010.** Effect of resveratrol on the development of porcine embryos produced *in vitro*. *J Reprod Develop* 56: 330-335. doi: 10.1262/jrd.09-174K
32. **Leibfried L, First NL. 1979.** Characterization of bovine follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J Anim Sci* 48: 76-86. doi: 10.2527/jas1979-48176x
33. **Li M, Kildegaard KR, Chen Y, Rodriguez A, Borodina I, Nielsen J. 2015.** De novo production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng* 32: 1-11. doi: 10.1016/j.ymben.-2015.08.007
34. **Liang W, Li X, Li C, Liao L, Gao B, Gan H, Yang Z, Liao L, Chen X. 2011.** Quercetin-mediated apoptosis via activation of the mitochondrial-dependent pathway in MG-63 osteosarcoma cells. *Mol Med Report* 4: 1017-1023. doi: 10.3892/mmr.2011.533.
35. **Liang S, Jin YX, Yuan B, Zhang JB, Kim NH. 2017.** Melatonin enhances the developmental competence of porcine somatic cell nuclear transfer embryos by preventing DNA damage induced by oxidative stress. *Sci Rep* 7: 11114. doi: 10.1038/s41598-017-11161-9. doi: 10.1038/s41598-017-11161-9.
36. **Liu S, Hou W, Yao P, Zhang B, Sun S, Nüssler AK, Liu L. 2010.** Quercetin protects against ethanol-induced oxidative damage in rat primary

- hepatocytes. *Toxicol in vitro* 24: 516-522. doi: 10.1016/j.tiv.2009.03.006
37. **Machado HK, Wanderley LS, Faustino LR, Da Silva CMG, De Figueiredo JR, Rodrigues APR. 2011.** Papel de agentes antioxidantes na criopreservação de células germinativas e embriões. *Acta Sci Vet* 39: 956.
  38. **Merton JS, Knijn HM, Flapper H, Dotinga F, Roelen BAJ, Vos PLAM, Mullaart E. 2013.** Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. *Theriogenology* 80: 365-371. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.04.025
  39. **Moraes G, Silva S, Dos Santos D, Pasin M, Pereira L, Lourdes M, Mezzalira A, et al. 2002.** Produção *in vitro* de embriões bovinos com soro de égua em diferentes fases do estro. *Acta Sci Vet* 30: 1-8.
  40. **Mukherjee A, Malik H, Saha AP, Dubey A, Singhal DK, Boateng S, Saugandhika S, et al. 2014.** Resveratrol treatment during goat oocytes maturation enhances developmental competence of parthenogenetic and hand-made cloned blastocysts by modulating intracellular glutathione level and embryonic gene expression. *J Assist Reprod Gen* 31: 229-239. doi: 10.1007/s10815-013-0116-9
  41. **Olson SE, Seidel GE. 2000.** Culture of *in vitro* produced bovine embryos with vitamin E improves development *in vitro* and after transfer to recipients. *Biol Reprod* 62: 248-252. doi: 10.1095/biolreprod62.2.248
  42. **Park MH, Min do S. 2011.** Quercetin-induced downregulation of phospholipase D1 inhibits proliferation and invasion in U87 glioma cells. *Biochem Bioph Res Co* 412: 710-715. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.08.037
  43. **Parrish J. 2014.** Bovine *in vitro* fertilization: *in vitro* oocyte maturation and sperm capacitation with heparin. *Theriogenology* 81: 67-73. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.08.005
  44. **Phongnimitr T, Liang Y, Srirattana K, Panyawai K, Sripunya N, Treetam-pinich C, Parnpai R. 2013.** Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Anim Sci J* 84: 719-725. doi: 10.1111/asj.12067
  45. **Rahim B, Jalal S, Yosef N. 2011.** Effect of cysteine supplementation on *in vitro* maturation of bovine oocyte. *Afr. J. Biotechnol* 10: 15830-15833. doi: 10.5897/AJB11.1686
  46. **Salzano A, Albero G, Zullo G, Neglia G, Abdel-Wahab A, Bifulco G, et al. 2014.** Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine *in vitro* produced embryos. *Anim Reprod Sci* 151: 91-96. doi: 10.1016/j.anireprosci.2014.09.018
  47. **Sameni HR, Javadinia SS, Safari M, Tabrizi MH, Khanmohammadi N, Parsaie H, Zarbakhsh S. 2018.** Effect of quercetin on the number of blastomeres, zona pellucida thickness, and hatching rate of mouse embryos exposed to actinomycin D: an experimental study. *Int J Reprod Biomed* 16: 101-108.
  48. **Sifer C, Sellami A, Poncelet C, Kulski P, Martin-Pont B, Bottero J, Porcher R, et al. 2006.** A prospective randomized study to assess the benefit of partial zona pellucida digestion before frozen-thawed embryo transfers. *Hum Reprod* 21: 2384-2389. doi: 10.1093/humrep/del149
  49. **Sovernigo TC, Adona PR, Monzani PS, Guemra S, Barros F, Lopes FG, Leal C. 2017.** Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reprod*

- Domest Anim 52: 561-569. doi: 10.1111/rda.12946
50. **Torres V, Urrego R, Echeverry JJ, Lopez A. 2016.** 181 Resveratrol during *in vitro* maturation improves the quality of bovine oocyte and enhances embryonic. *Reprod Fert Develop* 29: 199-199. doi: 10.1071/RDv29n1Ab181
51. **Truong T, Gardner DK. 2017.** Antioxidants improve IVF outcome and subsequent embryo development in the mouse. *Hum Reprod* 32: 2404-2413. doi: 10.1093/humrep/dex330
52. **Wang F, Tian X, Zhang L, He C, Ji P, Li Y, Tan D, Liu G. 2014.** Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after *in vitro* fertilization. *Fertil Steril* 101: 577-586. doi: 10.1016/j.fertnstert.2013.10.041
53. **Wang H, Jo YJ, Oh JS, Kim NH. 2017.** Quercetin delays postovulatory aging of mouse oocytes by regulating SIRT expression and MPF activity. *Oncotarget* 8: 38631-38641. doi: 10.18632/oncotarget.16219
54. **Wang X, Yan Y, Yang L, Li M, Zhong X. 2016.** Effect of quercetin on the expression of Bcl-2/Bax apoptotic proteins in endometrial cells of lipopolysaccharide-induced-abortion mice. *J Tradit Chin Med* 36: 737-742.
55. **You J, Lee J, Hyun SH, Lee E. 2012.** L-carnitine treatment during oocyte maturation improves *in vitro* development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* 78: 235-243. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.027
56. **Yu S, Long H, Lyu QF, Zhang QH, Yan ZG, Liang HX, Chai WR, Yan Z, Kuang YP, Qi C. 2014.** Protective effect of quercetin on the development of preimplantation mouse embryos against hydrogen peroxide-induced oxidative injury. *Plos One* 9: e89520. doi: 10.1371/journal.pone.0089520
57. **Zapata S, Piedrahita AM, Rojano B. 2014.** Capacidad atrapadora de radicales oxígeno (ORAC) y fenoles totales de frutas y hortalizas de Colombia. *Perspect Nutr Hum* 16: 25-36.
58. **Zullo G, Albero G, Neglia G, De Canditiis C, Bifulco G, Campanile G, Gasparrini B. 2016.** L-ergothioneine supplementation during culture improves quality of bovine *in vitro*-produced embryos. *Theriogenology* 85: 688697. doi: 10.1016/j.theriogenology.-2015.-10.008