

Estado da publicação: O preprint foi submetido para publicação em um periódico

## Avaliações iniciais da quercetina na maturação in vitro de oócitos ovinos

Bruna Moura Silva, Sara Rodrigues Pereira dos Santos, Brenna Maria Silva de Souza, Damaris Raquel Pires dos Santos, Érika Karoline de Oliveira Aureliano, Andreza Mayara Carneiro Lima, Luana Kealy Pimentel de Oliveira, Sueli de Oliveira Lima, Ailton Batista Pereira, Isabela Maria Lopes, Beatriz Cavalcanti de Freitas, Thais Thatiane dos Santos Souza, Pedro Humberto Félix de Sousa, Mabel Freitas Cordeiro, Edilson Soares Lopes Júnior

<https://doi.org/10.1590/SciELOPreprints.7759>

Submetido em: 2023-12-19

Postado em: 2023-12-22 (versão 1)

(AAAA-MM-DD)

## AVALIAÇÕES INICIAIS DA QUERCETINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS OVINOS

### BRUNA MOURA SILVA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2832-6689>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

Correspondência: [bruna.mouras@discente.univasf.edu.br](mailto:bruna.mouras@discente.univasf.edu.br)

### SARA RODRIGUES PEREIRA DOS SANTOS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-3984-3060>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### BRENNA MARIA SILVA DE SOUZA

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-1350-736X>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### DAMARIS RAQUEL PIRES DOS SANTOS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0005-5269-7983>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### ÉRIKA KAROLINE DE OLIVEIRA AURELIANO

ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-3875-2494>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### ANDREZA MAYARA CARNEIRO LIMA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6192-5937>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### LUANA KEALY PIMENTEL DE OLIVEIRA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6440-5515>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### SUELI DE OLIVEIRA LIMA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7085-5624>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### AILTON BATISTA PEREIRA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6360-1389>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### ISABELA MARIA LOPES

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2899-3468>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### BEATRIZ CAVALCANTI DE FREITAS

ORCID: <https://orcid.org/0009-0002-1073-1555>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### THAIS THATIANE DOS SANTOS SOUZA

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6887-5677>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### PEDRO HUMBERTO FÉLIX DE SOUSA

ORCID: <https://orcid.org/0009-0004-0218-0743>

Universidade do Estado da Bahia – Departamento de Tecnologia e Ciências Sociais, Juazeiro, Bahia, Brasil.

### MABEL FREITAS CORDEIRO

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1963-7311>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

### EDILSON SOARES LOPES JÚNIOR

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4790-8134>

UNIVASF -Universidade Federal do Vale do São Francisco –Campus Ciências Agrárias, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

**RESUMO:** O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da quercetina na MIV de oócitos e na subsequente PIV de embriões ovinos. Para isso, foram colhidos e selecionados oócitos divididos nos seguintes grupos de tratamento: grupo controle, contendo meio CON (controle); e grupos Q2, Q4 e Q8, com meio controle, acrescido de 2, 4 e 8  $\mu$ M de quercetina, respectivamente. Após a MIV foi avaliado o grau de expansão das células do cumulus, presença do primeiro corpúsculo polar (CP) e a outra parte dos oócitos seguiu para a fecundação *in vitro* (FIV), onde os oócitos foram incubados com os espermatozoides, por um período de 20 h. Em seguida, os presumíveis zigotos seguiram para o cultivo *in vitro* (CIV), por um período de 48 h e, ao final do processo, foi avaliada a taxa de estruturas clivadas. Os resultados foram expressos em porcentagem e comparados, usando o Teste do Qui-quadrado e foi considerada diferença

significativa quando  $P < 0,05$ . Avaliando a expansão das células do cumulus, os grupos CON e Q2 apresentaram as melhores taxas de expansão, quando comparadas aos grupos Q4 e Q8. Quanto à presença do 1º CP, foi possível observar que somente o grupo Q8 apresentou taxas menores, quando comparado ao grupo controle. Já avaliando a taxa de estruturas clivadas, foi possível observar que o grupo Q2 apresentou maior número quando comparado ao grupo Q8. A quercetina não influencia na maturação de oócitos ovinos.

**Palavras-chave:** Antioxidante; FIV; MIV; ovelha.

### INITIAL EVALUATIONS OF QUERCETIN ON THE *IN VITRO* MATURATION OF OVINE OOCYTES

**ABSTRACT:** The aim of this study was to evaluate the effect of quercetin on the *in vitro* maturation (IVM) of oocytes and the subsequent *in vitro* fertilization (IVF) of ovine embryos. For this purpose, oocytes were collected and divided into the following treatment groups: control group, containing CON medium (control); and groups Q2, Q4, and Q8, with control medium supplemented with 2, 4, and 8  $\mu\text{M}$  of quercetin, respectively. After IVM, the degree of cumulus cells expansion, presence of the first polar body (PB), and the other part of the oocytes proceeded to *in vitro* fertilization (IVF), where oocytes were incubated with spermatozoa for a period of 20 hours. Subsequently, the presumptive zygotes underwent *in vitro* culture (IVC) for 48 hours, and at the end of the process, the rate of cleaved structures was evaluated. The results were expressed in percentage and compared using the Chi-square test, with a significant difference considered when  $P < 0.05$ . Evaluating the expansion of cumulus cells, the CON and Q2 groups showed the best expansion rates compared to the Q4 and Q8 groups. Regarding the presence of the 1st PB, it was observed that only the Q8 group exhibited lower rates compared to the control group. When evaluating the rate of cleaved structures, it was observed that the Q2 group showed a higher number compared to the Q8 group. Quercetin does not influence the maturation of ovine oocytes.

**Key words:** Antioxidant; IVF; IVM; sheep.

### EVALUACIONES INICIALES DE LA QUERCETINA EN LA MADURACIÓN *IN VITRO* DE OVOCITOS OVINOS

**RESUMÉN:** El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la quercetina en la maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos y la posterior fertilización *in vitro* (FIV) de embriones ovinos. Para ello, se recolectaron y seleccionaron ovocitos divididos en los siguientes grupos de tratamiento: grupo control, que contenía medio CON (control); y los grupos Q2, Q4 y Q8, con medio control al que se le añadieron 2, 4 y 8  $\mu\text{M}$  de quercetina, respectivamente. Tras la MIV se evaluó el grado de expansión de las células del cúmulo, la presencia del primer corpúsculo polar (CP) y la otra parte de los ovocitos se utilizó para la fecundación *in vitro* (FIV), donde los ovocitos fueron incubados con espermatozoides durante un período de 20 horas. Posteriormente, los presuntos cigotos pasaron a cultivo *in vitro* (CIV) durante 48 horas y, al final del proceso, se evaluó la tasa de estructuras clivadas. Los resultados se expresaron en porcentaje y se compararon utilizando la prueba de Chi-cuadrado, considerando una diferencia significativa cuando  $P < 0,05$ . Al evaluar la expansión de las células del cúmulo, los grupos CON y Q2 mostraron las mejores tasas de expansión en comparación con los grupos Q4 y Q8. En cuanto a la presencia del 1er CP, se observó que solo el grupo Q8 mostró tasas más bajas en comparación con el grupo control. Al evaluar la tasa de estructuras clivadas, se observó que el

grupo Q2 mostrou un número mayor en comparación con el grupo Q8. La quercetina no influye en la maduración de ovocitos ovinos.

**Palabras clave:** Antioxidante; FIV; MIV; oveja.

## INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotécnica que auxilia no aceleração e melhoramento genético através do aumento do número de descendentes de uma mesma fêmea de elevado potencial genético (1).

Mesmo havendo diversos avanços e pesquisas, as taxas obtidas na maturação *in vitro*, que é uma das etapas dessa biotécnica, ainda são inferiores, quando comparadas às taxas obtidas nos processos *in vivo* (2). Essa realidade deve-se à manipulação celular nos processos *in vitro*, que produzem, excessivamente, espécies reativas de oxigênio (ERO), que causam estresse oxidativo, gerando danos ao oócito (3). Para combater as ERO, há a necessidade de utilizar fontes antioxidantes, como, por exemplo, a quercetina.

A quercetina (3, 3', 4', 5, 7-pentahidroxi-flavona) é um tipo de flavonóide natural, que pode ser encontrado em grande proporção na natureza, como na maçã, na cebola, em alguns grãos e, até mesmo, no vinho tinto. Estudos mostram que a quercetina pode prevenir a disfunção mitocondrial e reduzir as espécies reativas de oxigênio (ERO) (4). Em oócitos caprinos, a quercetina apresentou maiores taxas de maturação dos oócitos, em comparação com as obtidas com a cisteamina, que é um antioxidante padrão, além de apresentar elevada viabilidade e qualidade celular (5). A quercetina também diminuiu a apoptose e melhorou a viabilidade de oócitos ovinos vitrificados (6) e, em oócitos bovinos, melhorou a qualidade e regulou a família de genes BCL 2, além de estimular a produção de blastocistos (7). Em oócitos de camundongos expostos ao cromo, foi possível observar a diminuição do estresse oxidativo, sugerindo que a quercetina diminui os danos causados por substâncias tóxicas (8).

Apesar da quercetina apresentar bons resultados na maturação e desenvolvimento oocitário, ainda se torna necessário que estudos sejam realizados com a substância de forma individual na espécie ovina, com a finalidade de descobrir a sua concentração ideal, a fim de promover bons resultados na produção *in vitro* de embriões, após a fecundação *in vitro* dos oócitos. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da quercetina na maturação *in vitro* de oócitos sobre a produção *in vitro* de embriões ovinos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), sendo registrado sob o protocolo de nº 0006/271022.

Todos os meios e reagentes foram adquiridos na Sigma Aldrich®. As etapas ligadas à PIV foram realizadas no Laboratório de Fisiologia e Biotecnologia da Reprodução Animal (LAFIBRA), situado no Campus Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF) em Petrolina-PE, no período de maio e julho de 2023.

Os ovários utilizados foram obtidos em abatedouro local, imediatamente após o abate de ovelhas sem padrão racial definido (SRD) e foram transportados até o LAFIBRA, dentro de 1 hora, em solução de NaCl 0,9%, contendo 0,05 g de pentabiótico/L, sendo o pentabiótico composto por estreptomicina básica, dihidroestreptomicina básica, benzilpenicilina benzatina,

benzilpenicilina procaína e benzilpenicilina potássica, a uma temperatura de 33°C a 34°C, em garrafa térmica. No LAFIBRA, os ovários foram lavados, três vezes, em solução salina aquecida, retirados os tecidos adjacentes e mantidos em banho-maria, a 34°C. Para a colheita dos complexos cumulus-oócitos (CCO), foi utilizada uma bomba de vácuo a uma pressão de 20 mmHg, correspondendo a 5 mL/min, agulha 18G e o meio de aspiração composto por TCM199 com 25 mM de HEPES suplementado com 50 UI/mL heparina sódica, 500 UI de penicilina, 0,5 mg estreptomicina e 1,5 µg de anfotericina e 1% (v/v) de soro fetal bovino (SFB). Posteriormente à colheita, os CCO foram vertidos em placas de petri de 100 mm, analisados sob estereomicroscópio e classificados de acordo com Freitas, Melo (9), sendo selecionados para a maturação *in vitro* apenas os classificados Graus I e II.

Após a classificação oocitária, os complexos cumulus-oócitos (CCO) que apresentaram melhor qualidade foram, igualmente, divididos em quatro grupos de maturação: o grupo CON, no qual os CCO foram imersos em meio contendo TCM-199, suplementado com 500 UI de penicilina, 0,5 mg estreptomicina e 1,5 µg de anfotericina, 0,2 mM de piruvato de sódio, 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) e 10 UI/mL de eCG; e nos grupos Q2, Q4 e Q8, os oócitos foram maturados na presença do meio MIV do grupo CON, suplementado com 2, 4 e 8 µM de quercetina, respectivamente. Os CCO foram dispostos em placa de petri, em número de 15 CCO por gota de 75 µL de meio MIV, sob óleo mineral, durante 24 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub>.

Ao final do processo de maturação, os CCO maduros foram avaliados quanto à ocorrência ou não de expansão das células do cumulus. Além disso, foi estimado o grau de expansão das células do cumulus, classificando-os como: não expandido, parcialmente expandido ou totalmente expandido, conforme a metodologia de Marei, Wathes, Fouladi-Nashta (10).

Uma parte dos oócitos maturados foi desnuda através de sucessivas pipetagens e avaliada em microscópio invertido (BEL INV-100®; BEL, São Paulo, Brasil), para avaliar a presença do segundo corpúsculo polar no espaço perivitelínico. Além disso, foi avaliado a presença do ooplasma retraído.

Os oócitos maturados seguiram para a FIV. Nesse processo, o sêmen foi colhido de carneiros com fertilidade comprovada, pelo método da vagina artificial. Posteriormente, foram dispostos em um gradiente de Percoll 45%/90%. Os espermatozoides móveis foram recuperados por centrifugação, a 700G, por 15 minutos. O precipitado foi ressuspenso em 2 mL de meio de FIV (SOF®, suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 0,5 mg/mL de estreptomicina, 1,25 µg/mL de anfotericina B e 10 µg/mL de hipotaurina) e lavado por centrifugação (100G; 5 minutos). O novo precipitado foi ressuspenso em 2 mL de meio FIV. Após a aferição da concentração espermática total, a concentração final foi ajustada para 1 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL, no volume total de 50 µL/gota de meio FIV, em placa de petri, sob óleo mineral. Os oócitos, maturados juntamente com os espermatozoides selecionados e capacitados, foram inclusos em gotas de 50 µL de meio de fecundação *in vitro* (FIV). A FIV foi realizada por um período de 18 a 20 horas, em estufa de cultivo, a 38,5°C, contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Concluído o processo de FIV, os presumíveis zigotos foram desnudados por meio de sucessivas pipetagens, seguindo a metodologia de Mezzalira et al. (11).

Os presumíveis zigotos que foram desnudados foram, então, submetidos ao cultivo *in vitro* por 48 h, em meio contendo 50 µL de fluido sintético de oviduto (SOF), suplementado com 500 UI/mL de penicilina, 0,5 mg/mL de estreptomicina, 1,25 µg/mL de anfotericina B e 3

mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), sob óleo mineral, em placas de petri, contendo de 10 a 15 estruturas por gota. As placas foram cultivadas em estufa de cultivo a 38,5°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O número de estruturas clivadas foi registrado no fim do período de cultivo.

Os dados foram expressos em porcentagens e comparados usando o teste do Qui-quadrado no software Epi Info (Epi Info 7.2.5, Atlanta, GA, EUA, 2021). As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à expansão das células do cumulus, a inclusão de 2  $\mu\text{M}$  de quercetina não aumentou a taxa de expansão de CCO ovinos ( $P > 0,05$ ). Contudo, foi observado que o uso de 4  $\mu\text{M}$  e 8  $\mu\text{M}$  de quercetina reduziram a expansão das células do cumulus, quando comparada aos grupos CON e Q2 ( $P < 0,05$ ). Já em relação ao grau de expansão das células do cumulus, foi possível observar que não houve diferença estatística entre os grupos de tratamento, quando avaliado os graus de expansão totalmente e parcialmente expandido das células do cumulus ( $P > 0,05$ ) (Tabela 1).

Quando comparados os graus de expansão no mesmo tratamento, foi possível observar que todos os grupos apresentaram mais oócitos com células do cumulus totalmente expandidas, quando comparadas com os oócitos com células do cumulus parcialmente expandidas ( $P < 0,05$ ) (Tabela 1).

Tabela 1 – Graus de expansão de células do cumulus (%) de oócitos ovinos, maturados *in vitro* nos grupos controle (CON) e na presença de quercetina (Q2; Q4; Q8).

Trat.	N <sup>o</sup>	Taxa de expansão	Grau de expansão % (n)	
			Totalmente expandido	Parcialmente expandido
CON	162	94,4% (153/162) <sup>a</sup>	64,1% (98/153) <sup>aA</sup>	35,9% (55/153) <sup>aB</sup>
Q2	165	89,0% (147/165) <sup>a</sup>	67,4% (99/147) <sup>aA</sup>	32,6% (48/147) <sup>aB</sup>
Q4	165	81,2% (134/165) <sup>b</sup>	57,4% (77/134) <sup>aA</sup>	42,6% (57/134) <sup>aB</sup>
Q8	165	75,7% (125/165) <sup>b</sup>	69,6% (87/125) <sup>aA</sup>	30,4% (38/125) <sup>aB</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas indicam diferenças na mesma coluna ( $P < 0,05$ ). <sup>A,B,C</sup> Letras maiúsculas indicam diferenças na mesma linha ( $P < 0,05$ ).

Após o processo de MIV, os oócitos apresentam modificações que determinam se houve maturação ou não. Um dos aspectos morfológicos avaliados, é a expansão das células do cumulus, que ocorre através da produção de ácido hialurônico pelas células do cumulus. Essa produção ocorre através de diversos fatores produzidos pelo oócito e pela ação dos hormônios endógenos (12). Dessa forma, quanto maior a expansão das células do cumulus, maior a probabilidade dos oócitos estarem maduros.

Diferente dos nossos estudos, Jiao et al. (13) encontraram que a utilização de 10 e 20  $\mu\text{M}$  de quercetina, utilizado na MIV, promoveram maiores taxas de expansão das células do cumulus, quando comparado aos outros grupos de tratamento em oócitos suíno. Já Davoodian et al. (7) obtiveram que a utilização de quercetina não apresentou efeito significativo em relação à expansão das células do cumulus em oócitos bovinos. Silva et al. (5) mostraram que a concentração de 4  $\mu\text{M}$  de quercetina melhorou as taxas de expansão em oócitos caprinos. Já a

concentração de 8  $\mu\text{M}$  de quercetina resultou em uma menor proporção de oócitos com expansão de células do cumulus. Em oócitos humanos, foi possível observar que a quercetina protegeu as células do cumulus contra danos do estresse oxidativo nas concentrações abaixo de 40  $\mu\text{M}$ . Esse resultado pode ser explicado, visto que a utilização da quercetina, em concentrações ideais, equilibra a produção de espécies reativas de oxigênio, além de aumentar as enzimas antioxidantes, protegendo contra esses danos. Já na concentração de 50  $\mu\text{M}$ , a viabilidade celular diminuiu significativamente, demonstrando que grandes concentrações em oócitos humanos podem ser tóxicas (14).

Esses resultados demonstram que a utilização da quercetina pode variar de acordo com cada espécie, ou seja, para algumas, grandes concentrações podem ser tóxicas. Dessa forma, é necessário avaliar as especificações do oócitos de cada espécie, a fim de identificar quais as melhores concentrações para cada.

Uma explicação para que, nos nossos resultados, não tenha apresentado diferença estatística na expansão das células do cumulus é que em todos os grupos de tratamento foi utilizado a eCG, que tem efeito de função mista de FSH e LH, o que auxilia na expansão (15), através da sua capacidade de se ligar aos receptores de FSH e LH nas células dos cumulus (16).

Quando avaliada a taxa de oócitos com a presença do primeiro corpúsculo polar (CP), foi possível observar que a inclusão de 2  $\mu\text{M}$  e 4  $\mu\text{M}$  de quercetina não aumentaram a taxa oócitos com primeiro corpúsculo polar no espaço perivitelínico ( $P > 0,05$ ). Contudo, foi observado que o uso de 8  $\mu\text{M}$  de quercetina reduziram a taxa oócitos com primeiro corpúsculo polar, quando comparada aos grupos CON e Q2 ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2. Taxas de presença do primeiro corpúsculo polar e retração (%) de oócitos ovinos maturados *in vitro* nos grupos controle (CON) e na presença de quercetina (Q2; Q4; Q8).

Tratamentos	Nº	Taxa de oócitos com primeiro corpúsculo polar	Taxa de retração do ooplasma
CON	40	27,5% (11/40) <sup>a</sup>	45,0% (18/40) <sup>a</sup>
Q2	40	35,0% (14/40) <sup>a</sup>	47,5% (19/40) <sup>a</sup>
Q4	40	17,5% (7/40) <sup>ab</sup>	57,5% (23/40) <sup>a</sup>
Q8	40	12,5% (5/40) <sup>b</sup>	67,5% (27/40) <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas indicam diferenças na mesma coluna ( $P < 0,05$ ).

Semelhantes aos nossos estudos, Davoodian et al. (7), após utilizarem 2  $\mu\text{M}$  de quercetina na MIV de oócitos bovinos, identificaram uma maior porcentagem de oócitos com a presença do primeiro corpúsculo polar (CP) no espaço perivitelínico e em metáfase II (MII). Já em oócitos caprinos, Silva et al. (5) verificaram que a concentração que trouxe melhores taxas de MII foi a de 4  $\mu\text{M}$ . Já se tratando de oócitos suínos, as concentrações que apresentaram maiores taxas de extrusão do primeiro corpúsculo polar foram as concentrações de 5 e 10  $\mu\text{M}$ , já a concentração de 20  $\mu\text{M}$  apresentou menores taxas. No nosso estudo, a maior concentração (8  $\mu\text{M}$ ) também apresentou menores taxas. Dessa forma, podemos hipotetizar que a utilização de grandes concentrações pode ser tóxica para os oócitos e que essas concentrações vão variar de acordo com cada espécie. A quercetina, no nosso estudo, não aumentou a taxa de extrusão do primeiro CP. Isso pode ser explicado, observando o número experimental utilizado, que foi

baixo. A avaliação de um maior número de estruturas e também uma avaliação mais profunda da configuração da cromatina seria necessária para identificar melhor o estágio meiótico desses oócitos.

Já em relação à taxa de retração do ooplasma, não houve diferença estatística entre os grupos, porém o grupo Q8 apresentou uma tendência de apresentar maior retração do ooplasma desses oócitos após a MIV ( $P>0,05$ ) (Tabela 2).

Semelhante ao nosso estudo, ao avaliar também a retração do ooplasma de oócitos caprinos, Silva et al. (5) encontraram que a concentração de 8  $\mu\text{M}$  apresentou maiores taxas de retração, podendo hipotetizar novamente que altas concentrações da quercetina podem trazer danos ao oócito, o que pode acarretar em problemas nas etapas posteriores, já que a retração do ooplasma ocorre quando o oócito sofre algum dano, o que pode apresentar menores taxas de fecundação e subsequentes taxas de blastocisto. Também seria necessário que fosse utilizado um número experimental maior para identificar se a quercetina diminui as taxas de retração do ooplasma.

Já avaliando a taxa de estruturas clivadas após a fecundação *in vitro* dos oócitos maturados anteriormente, foi possível observar que a inclusão de quercetina não aumentou a taxa de estruturas clivadas ( $P>0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Taxa de estruturas clivadas (%) após fecundação *in vitro* de oócitos ovinos, maturados no grupos CON e na presença de quercetina (Q2; Q4; Q8).

Tratamentos	N	Taxa de estruturas clivadas
CON	122	22,1% (27/122) <sup>ab</sup>
Q2	125	31,2% (39/125) <sup>a</sup>
Q4	125	24,8% (31/125) <sup>ab</sup>
Q8	125	15,2% (19/125) <sup>b</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas indicam diferenças na mesma coluna ( $P<0,05$ ).

Como foi observado uma tendência de crescimento no grupo Q2 em relação às estruturas clivadas, pode-se hipotetizar que, aumentando o número experimental, esse mesmo grupo apresentaria uma maior quantidade de estruturas clivadas.

Tabela 4. Número de blastômeros (%) de estruturas clivadas após fecundação *in vitro* de oócitos ovinos, maturados com os grupos CON e na presença de quercetina (Q2; Q4; Q8).

Tratamento	Estádio Embrionário			
	2 blastômeros	4 blastômeros	8 blastômeros	+ 8 de blastômeros
CON	0,0% (0/27) <sup>b</sup>	7,4% (2/27) <sup>b</sup>	18,5% (5/27) <sup>a</sup>	74,0% (20/27) <sup>a</sup>
Q2	12,8% (5/39) <sup>ab</sup>	15,3% (6/39) <sup>ab</sup>	2,5% (1/39) <sup>ab</sup>	69,2% (27/39) <sup>a</sup>
Q4	25,8% (8/31) <sup>a</sup>	31,2% (10/31) <sup>a</sup>	0,0% (0/31) <sup>b</sup>	61,3% (19/31) <sup>a</sup>
Q8	15,7% (3/19) <sup>b</sup>	10,5% (2/19) <sup>ab</sup>	0,0% (0/19) <sup>ab</sup>	42,1% (8/19) <sup>a</sup>

<sup>a,b,c</sup> Letras minúsculas indicam diferenças na mesma coluna ( $P<0,05$ ).

Dentro das estruturas clivadas, ainda foi possível avaliar o número de blastômeros em cada estrutura. Dessa maneira, foi possível observar que, em relação às estruturas que



apresentaram 2 blastômeros, o grupo Q4 foi superior, quando comparada aos grupos CON e Q8 ( $P < 0,05$ ), porém não diferiu do grupo Q2 ( $P > 0,05$ ). Já em relação às estruturas clivadas com a presença de 4 blastômeros, somente o grupo Q4 apresentou-se maior que o grupo CON ( $P < 0,05$ ), porém foi igual aos grupos Q2 e Q8 ( $P > 0,05$ ). Se tratando das estruturas com a presença de 8 blastômeros, o grupo Q4 apresentou-se menor que o grupo CON ( $P < 0,05$ ), porém não diferiu dos grupos Q2 e Q8 ( $P > 0,05$ ). E, por fim, avaliando estruturas com mais de 8 blastômeros, foi possível identificar que os grupos se apresentaram iguais ( $P > 0,05$ ) (Tabela 4).

Diferente dos nossos estudos, ao avaliar a taxa de blastocisto após a MIV de oócitos de camundongos idosos, foi possível observar que a utilização de 10  $\mu$ M apresentou maiores taxas de estruturas clivadas, levando a considerar que a quercetina melhora a competência e a maturação oocitária, o que acarreta no melhor desenvolvimento embrionário (4). Em bovinos, a utilização de quercetina apresentou maior proporção de sobrevivência de zigotos, estruturas clivadas e blastocistos. A utilização de quercetina em oócitos ovinos vitrificados-aquecidos nos processos de MIV e FIV não apresentou diferença significativa em relação à clivagem e à formação de blastocisto (7).

Como no nosso estudo o cultivo ocorreu somente por dois dias e com a utilização somente de  $CO_2$ , diversas estruturas apresentaram somente 2 a 4 blastômeros. Caso fosse feito um cultivo de mais dias (7 dias) ou fosse utilizado uma estufa contendo os três gases ( $O_2$ ,  $N_2$  e  $CO_2$ ), os resultados poderiam mostrar que a quercetina melhoraria esse parâmetro.

Assim, é necessário investigar qual a melhor concentração da quercetina em diferentes espécies.

## **CONCLUSÃO**

A quercetina não influenciou na maturação de oócitos ovinos nesse estudo, tendo em vista que o número experimental não foi suficiente para que ocorresse diferença estática entre os grupos de tratamento e o controle. Porém, são necessários mais estudos com avaliações mais detalhadas e avaliação de um maior número de estruturas a fim de identificar como age a quercetina no oócito ovino.

## **DECLARAÇÃO DE CONFLITO DE INTERESSE**

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

## **DECLARAÇÃO DE DISPONIBILIDADE DE DADOS DA PESQUISA**

Todo o conjunto de dados de apoio aos resultados deste estudo foi publicado no próprio artigo.

## **DECLARAÇÃO DE CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES**

Autor 1 – Conceitualização, curadoria de dados, pesquisa, metodologia, administração do projeto e redação do manuscrito.

Autor 2 – Pesquisa e metodologia.

Autor 3 – Pesquisa e metodologia.

Autor 4 – Pesquisa e metodologia.

Autor 5 – Pesquisa e metodologia.

Autor 6 – Pesquisa e metodologia.

Autor 7 – Análise de dados, pesquisa, metodologia e redação do manuscrito.

Autor 8 – Pesquisa, metodologia e redação do manuscrito.

Autor 9 – Pesquisa e metodologia.

Autor 10 – Pesquisa e metodologia.

Autor 11 – Redação e revisão final do manuscrito.

Autor 12 – Pesquisa e metodologia.

Autor 13 – Pesquisa e metodologia.

Autor 14 – Pesquisadora supervisora responsável pela pesquisa relatada, participação ativa na análise dos dados e revisão da escrita final do manuscrito.

Autor 15 – Pesquisador supervisor responsável pela pesquisa relatada, participação ativa na análise dos dados e revisão da escrita final do manuscrito.

## REFERÊNCIAS

1. Cavalieri FLB, Morotti F, Seneda MM, Colombo AHB, Andreazzi MA, Emanuelli IP, Rigolon LP. Improvement of bovine *in vitro* embryo production by ovarian follicular wave synchronization prior to ovum pick-up. *Theriogenology*. 2018;117:57–60. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.026
2. Paramio MT, Izquierdo D. Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*. 2016;86(1):152–9. doi: 10.1016/j.theriogenology.2016.04.027
3. Crocomo L, Filho W, Alvarenga F, Bicudo S. Peculiarities of oocyte harvesting for *in vitro* production of sheep embryos. *Rev Bras Reprod Animal*. 2012;(1):25–31.
4. Cao Y, Zhao H, Wang Z, Zhang C, Bian Y, Liu X, et al. Quercetin promotes *in vitro* maturation of oocytes from humans and aged mice. *Cell Death & Disease*. 2020;11(11). doi: 10.1038/s41419-020-03183-5
5. Silva AAA, Silva MNP, Figueiredo LBF, Gonçalves JD, Silva MJS, Loiola MLG, Bastos BDM, Oliveira RA, Ribeiro LGM, Barberino, Gouveia BB, Monte APO, Nogueira DM, Cordeiro MF, Matos MHT, Lopes Júnior ES. Quercetin influences *in vitro* maturation, apoptosis and metabolically active mitochondria of goat oocytes. *Zygote*. 2018;26(6):465–70. doi: 10.1017/S0967199418000485
6. Davoodian N, Kadivar A, Ahmadi E, Nazari H, Mehrban H. Quercetin effect on the efficiency of ovine oocyte vitrification at GV stage. *Theriogenology*. 2021;174:53–9. doi: 10.1016/j.theriogenology.2021.07.027
7. Davoodian N, Kadivar A, Davoodian N, Ahmadi E, Nazari H, Mehrban H. The effect of quercetin in the maturation media on cumulus-granulosa cells and the developmental competence of bovine oocytes. *Theriogenology*. 2022 Sep;189:262–9. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.06.026

8. Gumus E, Sisko A, Burçin İrem Abas, Busra Demirkan, Özge Çevik. Quercetin protects mouse oocytes against chromium-induced damage *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2023;75:127087–7. doi: 10.1016/j.jtemb.2022.127087
9. Freitas VJF, Melo LM. *In vitro* embryo production in small ruminants. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 2010;39:409–13. doi: 10.1590/s1516-35982010001300045
10. Marei WF, Wathes DC, Fouladi-Nashta AA. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction*. 2010 Jun;139(6):979–88.
11. Mezzalira A, Cucco DC, Bunn S, Cruz FB, Werlich DE, Vieira AD, Santos RM. Metodologias de desnudamento parcial de oócitos bovinos maturados e submetidos à vitrificação. 2005;31;10(2). doi: 10.5380/avs.v10i2.4425
12. Santos JDR, Batista RITP, Magalhães LC, Paula Jr. AR, Souza SS, Salamone DF, Bhat MH, Paula Jr AR, Souza SS, Salamone DF, Bhat MH, Teixeira DIA, Feitas VJ, Melo LM. Overexpression of hyaluronan synthase 2 and gonadotropin receptors in cumulus cells of goats subjected to one-shot eCG/FSH hormonal treatment for ovarian stimulation. *Animal Reproduction Science*. 2016;170:15–24. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.03.008
13. Jiao Y, Wang Y, Jiang T, Wen K, Cong P, Chen Y, He Z. Quercetin protects porcine oocytes from *in vitro* aging by reducing oxidative stress and maintaining the mitochondrial functions. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022;10. doi: 10.3389/fcell.2022.915898
14. Rashidi Z, Aleyasin A, Eslami M, Nekoonam S, Zendedel A, Bahramrezaie M, Amidi F. Quercetin protects human granulosa cells against oxidative stress via thioredoxin system. *Reproductive Biology*. 2019;19(3):245–54. doi: 10.1016/j.repbio.2019.07.002
15. Bastos BDM, Silva NPS, Gonçalves PR, Candido AECM, Barberino RS, Monte APO, Nogueira DM, Cordeiro MF, Matos MHT, Lopes Júnior ES. Effect of different gonadotropins on *in vitro* maturation of sheep oocytes. *Semina: Ciências Agrárias*. 2023;43(6):2731–42. doi: 10.5433/1679-0359.2022v43n6p2731
16. Mingoti GZ, Garcia JM, Rosa e Silva AAM. Steroidogenesis in cumulus cells of bovine cumulus–oocyte-complexes matured *in vitro* with BSA and different concentrations of steroids. *Animal Reproduction Science*. 2002;69(3-4):175–86. doi: 10.1016/S0378-4320(01)00187-7

## Este preprint foi submetido sob as seguintes condições:

- Os autores declaram que estão cientes que são os únicos responsáveis pelo conteúdo do preprint e que o depósito no SciELO Preprints não significa nenhum compromisso de parte do SciELO, exceto sua preservação e disseminação.
- Os autores declaram que os necessários Termos de Consentimento Livre e Esclarecido de participantes ou pacientes na pesquisa foram obtidos e estão descritos no manuscrito, quando aplicável.
- Os autores declaram que a elaboração do manuscrito seguiu as normas éticas de comunicação científica.
- Os autores declaram que os dados, aplicativos e outros conteúdos subjacentes ao manuscrito estão referenciados.
- O manuscrito depositado está no formato PDF.
- Os autores declaram que a pesquisa que deu origem ao manuscrito seguiu as boas práticas éticas e que as necessárias aprovações de comitês de ética de pesquisa, quando aplicável, estão descritas no manuscrito.
- Os autores declaram que uma vez que um manuscrito é postado no servidor SciELO Preprints, o mesmo só poderá ser retirado mediante pedido à Secretaria Editorial do SciELO Preprints, que afixará um aviso de retratação no seu lugar.
- Os autores concordam que o manuscrito aprovado será disponibilizado sob licença [Creative Commons CC-BY](#).
- O autor submissor declara que as contribuições de todos os autores e declaração de conflito de interesses estão incluídas de maneira explícita e em seções específicas do manuscrito.
- Os autores declaram que o manuscrito não foi depositado e/ou disponibilizado previamente em outro servidor de preprints ou publicado em um periódico.
- Caso o manuscrito esteja em processo de avaliação ou sendo preparado para publicação mas ainda não publicado por um periódico, os autores declaram que receberam autorização do periódico para realizar este depósito.
- O autor submissor declara que todos os autores do manuscrito concordam com a submissão ao SciELO Preprints.