



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARCELA BORTOLETTO CEREZETTI

**IMPACTO DO ANTIOXIDANTE QUERCETINA SOBRE A
INTEGRIDADE MORFOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO
FOLICULAR NO CULTIVO *IN VITRO* DE FRAGMENTOS
OVARIANOS DE FÊMEAS *BOS INDICUS***

Londrina - PR
2021

MARCELA BORTOLETTO CEREZETTI

**IMPACTO DO ANTIOXIDANTE QUERCETINA SOBRE A
INTEGRIDADE MORFOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO
FOLICULAR NO CULTIVO *IN VITRO* DE FRAGMENTOS
OVARIANOS DE FÊMEAS *BOS INDICUS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Morotti

Londrina - PR
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

B739 Cerezetti, Marcela Bortoletto .

Impacto do antioxidante quercetina sobre a integridade morfológica e desenvolvimento folicular no cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de fêmeas *Bos indicus* / Marcela Bortoletto Cerezetti. - Londrina, 2021.
58 f. : il.

Orientador: Fábio Morotti.

Dissertação (Mestrado Profissional em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias, 2021.

Inclui bibliografia.

1. Biotécnica reprodutiva - Tese. 2. Ovário - Tese. 3. Bovino - Tese. I. Morotti, Fábio . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Clínicas Veterinárias. III. Título.

CDU 619

MARCELA BORTOLETTO CERZETTI

**IMPACTO DO ANTIOXIDANTE QUERCETINA SOBRE A
INTEGRIDADE MORFOLÓGICA E DESENVOLVIMENTO
FOLICULAR NO CULTIVO *IN VITRO* DE FRAGMENTOS
OVARIANOS DE FÊMEAS *BOS INDICUS***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínicas Veterinárias da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre em Clínicas Veterinárias.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Morotti
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dra. Evelyn Rabelo Andrade
Universidade Federal de Rondônia

Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 22 de Janeiro de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Creusa e Luíz, pelo imenso apoio, incentivo, amor, sabedoria e educação que me proporcionaram até hoje para que eu me desenvolvesse e realizasse meus sonhos!

Aos meus avós maternos Tereza *in memoriam* e Giordano pelo carinho, amor, cuidado, educação e compreensão por não estar sempre perto deles fisicamente, mas sempre estão no meu coração, para que eu chegasse até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo enorme amor, paciência, ajuda, proteção ao me guiar pelos caminhos para chegar até aqui. Ao colocar pessoas incríveis na minha vida que me inspiram, me fizeram entender que conhecimento nunca é demais e é a única coisa que ninguém pode tirar de nós. Também permitiu compreender ao estudar que nada sei perante tudo o que Ele criou de uma forma tão perfeita.

Ao professor Dr. Fábio Morotti pela orientação, conhecimento, paciência e oportunidades de crescimento profissional que foram muito importantes desde o final da graduação até hoje. Agradeço muito pela confiança depositada ao aceitar me orientar no Mestrado, proporcionado à chance de realizá-lo, pela sua dedicação, integridade e determinação que são um grande exemplo. Também gostaria de ressaltar que é um grande exemplo de professor. E a professora Elis que também é um grande exemplo de professora e pessoa, sou muito grata a este casal.

Aos membros da banca de qualificação (Profa. Dra. Katia Cristina Silva-Santos e Profa. Dra. Evelyn Rabelo Andrade) e defesa (Profa. Dra. Evelyn Rabelo Andrade e Prof. Dr. Marcelo Marcondes Seneda) agradeço pelas importantes sugestões, contribuições e pelo aceite em participarem deste momento importante em minha carreira profissional, dedicando tempo e conhecimento para contribuir com este trabalho.

Ao Professor Dr. Marcelo Marcondes Seneda pelos conhecimentos e ensinamentos compartilhados, e principalmente pela oportunidade de participar das atividades e realizar o estudo no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução Animal (ReproA).

Ao professor Dr. Waldiceu Aparecido Verri Júnior e a Dra. Camila Ferraz pela parceria que permitiu a realização da análise do potencial antioxidante, como pela ajuda e explicações para redação do artigo.

A todos os professores da pós-graduação pela excelência em transmitir os seus conhecimentos, preparar e ministrar as aulas e esclarecer dúvidas.

A todos os colegas, pós-graduandos e estagiários, do ReproA pelo companheirismo, pelas conversas, risadas e bons momentos vividos nesses 2 anos. Em especial a Suellen González, Camila Bizarro da Silva, Andressa Lindquist, Eduardo Rosignolo, João Paulo Lolatto, Juliana, Denis Bonato, Francielle Bonato, Larrisa Bergamo, Camila Bortolheiro, Amanda Zangirolamo, Fábio Morais, Nathália Covre e a Tamires Sanches pela amizade e carinho.

Agradeço as amigas, Suellen e Camila, que além de contribuírem grandemente no presente trabalho, participaram ativamente na minha formação profissional e pessoal. Saibam que nossa amizade é sincera e sou muito grato a vocês!

As amigas desde a graduação que mesmo estando algumas longe ou muito ocupadas com a residência/ trabalho são amigas e me apoiam sempre, Carolina, Paola, Ana Paula, Josiane, Ana Laura, Rafaelli e Roberta.

A toda minha família, mas de modo especial aos meus pais (Creusa e Luíz), pelo exemplo de dedicação, integridade, bondade, de vida e pela luta constante para proporcionar minha formação e educação. Aos meus avós maternos Tereza (*in memoriam*) e Giordano pela força, orações, apoio e carinho. A minha avó sempre foi e sempre será o meu maior exemplo de que o amor, gratidão, fé e vontade de viver são essenciais na vida, já que contrariou até as estatísticas e a medicina. Foi um verdadeiro milagre poder ter conviado com ela não só 2 dois anos após o seu diagnóstico (como disseram os médicos), mas 8 anos. Todas as conquistas do passado, do presente e do futuro pertencem a vocês.

Aos meus primos e tios pela força e carinho. E aos meus sobrinhos, Benjamin e Saskia pelo carinho, momentos de felicidade, brincadeiras e amor. Além dos meus irmãos Sheila e Rafael pelos momentos de apoio, companheirismo e orientações.

E agradeço a todos que ajudaram nesse projeto de forma direta e indireta, e possibilitaram sua realização, desde a coleta do material até a finalização dos resultados.

Muito obrigada!

CERZETTI, Marcela Bortoletto. **Impacto do antioxidante quercetina sobre a integridade morfológica e desenvolvimento folicular no cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de fêmeas *Bos indicus***. 2021.58 fls. Dissertação (Mestrado em Clínicas Veterinárias) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A quercetina é um antioxidante com diferentes efeitos biológicos. No entanto, poucos estudos avaliaram a ação antioxidante desse composto no tecido ovariano. Dessa forma, o objetivo foi avaliar o efeito diferentes concentrações de quercetina no meio de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de fêmeas bovinas sobre suporte de gel de agarose quanto à morfologia, desenvolvimento e estresse oxidativo. Foram utilizados 6 pares de ovários (n = 12) de novilhas Nelore obtidos em abatedouro local e submetidos ao sistema de cultivo *in vitro* para avaliação histológica e análise do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP). Cada par de ovários foi dividido em 9 fragmentos de aproximadamente 3x3x1 mm, sendo que 1 fragmento de cada animal foi fixado em *Bouin* por 24h (controle histologia), ou congelado (-80°C; controle FRAP). Os demais fragmentos (n = 8) do mesmo ovário foram distribuídos um para cada concentração de 0 (MEM), 10 (Q10), 25 (Q25) e 50 µg/mL (Q50) de quercetina adicionada ao MEM suplementado com ITS, piruvato, glutamina, hipoxantina, BSA, penicilina e estreptomicina durante 5 e 10 dias de cultivo. No final de cada cultivo, os fragmentos foram processados pela histologia clássica, a coloração realizada pelo ácido periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina, e a leitura dos fragmentos em microscopia óptica. Os folículos pré-antrais foram classificados em primordial ou em desenvolvimento (primário e secundário), e segundo a integridade (íntegro e degenerado). Os fragmentos destinados à análise do FRAP foram imediatamente congelados após o final de cada dia de cultivo, e posteriormente analisados para determinar o potencial antioxidante dos tratamentos. Análise estatística foi realizada empregando o teste de Qui-quadrado ou ANOVA seguido do teste de Tukey (p<0.05). O tratamento Q25 apresentou significativa proporção de folículos íntegros totais durante o cultivo por 5 dias (67,3%; 105/156; p=0,03) em comparação aos outros tratamentos. Já no cultivo por 10 dias, a mesma concentração (Q25; 57,14%; p=0,01) foi significativa e semelhante ao controle cultivado (MEM; 48,37%). A proporção de folículos em desenvolvimento íntegros totais também foi relevante para o tratamento Q25 (68,7%; p = 0,05) e semelhante (p=0,05) ao tratamento D5 Q50 (57,5%). Já no cultivo por 10 dias, a proporção de folículos em desenvolvimento íntegros totais foi significativa para o tratamento Q25 quando comparado aos demais tratamentos (p=0,008). Em relação ao potencial antioxidante avaliado pelo FRAP, o tratamento D10 Q25 foi relevante em relação aos demais (D10 MEM, Q10 e Q50) e não houve diferença (p>0,05) na análise após o cultivo por 5 dias entre os tratamentos cultivados. Conclui-se que o tratamento Q25 melhor preservou a integridade morfológica dos folículos em desenvolvimento por 5 e 10 dias de cultivo, além de promover o melhor potencial antioxidante após 10 dias de cultivo em fragmentos de tecido ovariano bovino.

Palavras-chave: Cultivo *in situ*. Foliculogênese. Potencial antioxidante. Ovário. Bovinos.

CEREZETTI, Marcela Bortoletto. 2021. **Impact of the antioxidant quercetin on morphological integrity and follicular development in the *in vitro* culture of *Bos indicus* female ovarian fragments.** 58 fls. Dissertation (Master in Veterinary Clinics) – State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Quercetin is an antioxidant with different biological effects. However, few studies have evaluated the antioxidant action of this compound in the ovary tissue. In this way, the effect of different concentrations of quercetin in the *in vitro* culture medium of bovine females ovarian fragments on agarose gel support in relation to morphology, development and oxidative stress. Six ovaries pairs (n = 12) of Nelore heifers obtained from a local slaughterhouse and submitted to *in vitro* culture system were used for histological evaluation and analysis of the antioxidant power of iron reduction (FRAP). Each pair of ovaries was divided into 9 fragments of approximately 3x3x1 mm, with 1 fragment of each animal fixed in Bouin for 24 hours (histology control), or frozen (-80 ° C; FRAP control). The others fragments (n = 8) of the same ovary were distributed one for each concentration of 0 (MEM), 10 (Q10), 25 (Q25) and 50 µg / mL (Q50) of quercetin added to the MEM supplemented with ITS, pyruvate, glutamine, hypoxanthine, BSA, penicillin and streptomycin for 5 and 10 days of culture. At the end of each culture, the fragments were processed by classical histology, stained by periodic acid from Schiff (PAS) and Hematoxylin, and the fragments were read by optical microscopy. The preantral follicles were classified as primordial or in development (primary and secondary), and according to integrity (intact and degenerate). The fragments destined for the analysis of the FRAP were immediately frozen after the end of each day of culture, and later analyzed to determine the antioxidant potential of the treatments. Statistical analysis was performed using the Chi-square test or ANOVA followed by the Tukey test (P <0.05). Treatment Q25 showed a significant proportion of total intact follicles during culture for 5 days (67.3%; 105/156; p = 0.03) compared to other treatments. In the case of culture for 10 days, the same concentration (Q25; 57.14%; p = 0.01) was significant and similar to the cultivated control (MEM; 48.37%). The proportion of total intact developing follicles was also relevant for treatment Q25 (68.7%; p = 0.05) and similar (p = 0.05) to treatment D5 Q50 (57.5%). In culture for 10 days, the proportion of total intact developing follicles was significant for treatment Q25 when compared to other treatments (p = 0.008). Regarding the antioxidant potential evaluated by FRAP, the D10 Q25 treatment was relevant compared to the others (D10 MEM, Q10 and Q50) and there was no difference (p > 0.05) in the analysis after culture for 5 days among the cultivated treatments. It is concluded that the Q25 treatment preserved the morphological integrity of the developing follicles for 5 and 10 days of culture, in addition to promoting the best antioxidant potential after 10 days of culture in fragments of bovine ovarian tissue.

Key words: *in situ* Culture. Folliculogenesis. Antioxidant potential. Ovary. Bovine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de Literatura

Figura 1 – Representação esquemática das origens fetais da reserva ovariana Adaptado de Grive; Freiman (2015).....	17
Figura 2 – Esquema representando o ovário com suas estruturas essenciais durante o crescimento folicular até a ovulação. Adaptado de https://www.britannica.com/science/ovary-animal-and-human	19
Figura 3 – Fatores-chave relacionados ao crescimento e hormônios dentro do folículo primordial e em desenvolvimento de acordo com o compartimento (células do oócito, granulosa e teca) em ruminantes.....	24
Quadro 1 – Exemplos de genes expressos e fatores de transcrição específicos relacionados à fase inicial de desenvolvimento folicular.....	21

Artigo

Figura 1 – Delineamento experimental utilizado para cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais bovinos em meio controle (Meio essencial mínimo - MEM) suplementado com diferentes concentrações de quercetina (0,10, 25 e 50 µg/mL).....	41
Figura 2 – Referência à classificação morfológica utilizada para os folículos pré-antrais. (a) folículo primordial íntegro (seta), (b) folículo primário íntegro e (c) folículo secundário íntegro. As seções foram coradas pelo Schiff com ácido periódico (PAS) e hematoxilina. (c) e 100x ampliação (a e b).....	44
Figura 3 – Porcentagem total de folículos íntegros avaliados durante 5 dias de cultivo <i>in vitro</i> de fragmentos ovarianos bovinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM) ou adicionado com diferentes concentrações de Quercetina (10, 25 e 50 µg/mL).....	45
Figura 4 – Porcentagem total de folículos íntegros avaliados durante 10 dias de cultivo <i>in vitro</i> de fragmentos ovarianos bovinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM) ou adicionado com diferentes concentrações de Quercetina (10, 25 e 50 µg/mL).....	46
Figura 5 – Níveis de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) analisados nos dias 0 (controle não cultivado), 5 e 10 de cultivo <i>in vitro</i> em meio essencial mínimo com adição da	

quercetina em 0, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os dados estão apresentados na forma de mediana e erro padrão (\pm).....47

Figura 6 - Níveis de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) analisados nos dias 0 (controle não cultivado) 10 de cultivo *in vitro* em meio essencial mínimo (MEM) com adição da quercetina em 0, 10, 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os dados estão apresentados na forma de mediana e erro padrão.....48

LISTA DE TABELAS

Artigo

Table 1 – Porcentagem total de folículos íntegros avaliados durante 5 ou 10 dias de cultivo <i>in vitro</i> de fragmentos ovarianos bovinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM*) ou adicionado com diferentes concentrações de Quercetina (10, 25, e 50 ng/mL).....	49
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMH	- <i>anti-Müllerian hormone</i> - hormônio antimuleriano
ANOVA	- análise de variância
BMPs 7	- <i>bone morphogenetic proteins 7</i> ; proteínas morfogenéticas ósseas 7
BMPs 15	- <i>bone morphogenetic proteins 15</i> ; proteínas morfogênicas ósseas 15
CFA	- contagem de folículos antrais
CL	- corpo lúteo
°C	- graus Celsius
DP/SD	- desvio padrão
EGF	- <i>epidermal growth factor</i> ; fator de crescimento epidermal
EROs	- espécies reativas de oxigênio
FGF 2	- <i>fibroblast growth factor 2</i> ; fator de crescimento de fibroblasto 2
FGF 10	- <i>fibroblast growth factor 10</i> ; fator de crescimento de fibroblasto 10
FOPA	- folículos ovarianos pré-antrais
FSH	- <i>follicle stimulating hormone</i> ; hormônio folículo estimulante
GDF-9	- <i>growth differentiation factors 9</i> ; fator de diferenciação de crescimento 9
IGF 1	- <i>Insulin-like growth factor 1</i> ; fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGF 2	- <i>Insulin-like growth factor 2</i> ; fator de crescimento semelhante à insulina 2
ITS	- insulina transferrina e selênio
KL	- <i>kit ligand</i>
LH	- <i>Luteinizing hormone</i> ; hormônio luteinizante
MEM	- meio essencial mínimo
mg	- miligrama
µg	- micrograma
mL	- mililitros
MOIFOPA	- manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais
NOBOX	- <i>newborn ovary homeobox protein factor</i> ; homeobox do ovário do recém-nascido
N°	- número
PAS	- <i>periodic acid-schiff</i> - ácido periódico de schiff
SOHLH	- <i>spermatogenesis and oogenesis-specific basic helix-loop-helix</i> ; fator específico da oogênese e da espermatogênese
TGF- β	- <i>transforming growth factor</i> ; fator transformador do crescimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1	Oogênese.....	15
2.2	Folículogênese.....	17
2.3.	Classificação dos folículos ovarianos.....	18
2.3.1	Folículos pré-antrais.....	20
2.3.1.1	Folículos primordias.....	20
2.3.1.2	Folículos primários.....	22
2.3.1.3	Folículos secundários.....	22
2.3.2	Folículos antrais.....	22
2.4	População Folicular.....	23
2.5	Crescimento, Ativação e Atresia folicular	23
2.6	Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	26
2.6.1	Antioxidantes aplicados no Cultivo <i>in vitro</i>	27
	REFERÊNCIAS	29
3	HIPÓTESE.....	37
4	OBJETIVOS.....	38
4.1	Objetivo geral.....	38
4.2	Objetivos específicos.....	38
5	ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO	39
	INTRODUÇÃO.....	39
	MATERIAL E MÉTODOS.....	40
	<i>Obtenção e transporte dos ovário.....</i>	<i>40</i>
	<i>Preparo do Gel de Agarose.....</i>	<i>41</i>
	<i>Cultivo in vitro de folículos pré-antrais.....</i>	<i>41</i>
	<i>Delineamento experimental.....</i>	<i>41</i>
	<i>Processamento histológico.....</i>	<i>42</i>

	<i>Classificação e análise da integridade folicular.....</i>	43
	<i>Ensaio antioxidante do poder de redução do ferro (FRAP).....</i>	43
	<i>Análise Estatística.....</i>	43
	RESULTADOS.....	44
	DISCUSSÃO.....	51
	CONCLUSÃO.....	53
	REFERÊNCIAS.....	54
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58

1. INTRODUÇÃO

As biotécnicas reprodutivas têm contribuído para o desenvolvimento de pesquisas na área básica e aplicada. Nesse contexto, a área básica é essencial para esclarecer os questionamentos ainda presentes tanto na fisiologia reprodutiva, como também no desenvolvimento de condições patológicas como a síndrome do ovário policístico, falha ovariana prematura e infertilidade em humanos (SMITH et al., 2014). Outra possibilidade para estudar a fisiologia reprodutiva em fêmeas é a utilização dos animais domésticos monovulatórios como modelo de estudo devido à similaridade entre o ciclo menstrual e o ciclo estral (NEVES; MARQUES, 2008). Entre os animais domésticos, a espécie bovina tem se destacado como modelo para estudos *in vitro* pelo fácil acesso aos ovários provenientes de abatedouro e por fornecer dados importantes sobre a manutenção da fertilidade. Diversos estudos podem ser conduzidos a partir de ovários bovinos, os quais vão desde estudos sobre a população folicular até a criopreservação de folículos e oócitos (LANGBEEN et al., 2015).

A biotécnica de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais permite a realização de estudos nas fases iniciais de crescimento folicular, e tem como objetivo viabilizar o desenvolvimento dos folículos e maturação dos oócitos desde o estágio de primordial (FIGUEREDO et al., 2008). O ovário mamífero é constituído por uma população com aproximadamente 90% dos folículos na fase de pré-natal (AERTS; BOLS, 2010), mas a grande parte desses folículos (99,9%) entrará em atresia antes de se desenvolver até a fase de pré-ovulatório (MORITA; TILLY, 1999). Assim, estudos com a aplicação da biotécnica de cultivo *in vitro* almejam permitir a utilização dos folículos pré-antrais para aumentar a eficiência reprodutiva tanto nos rebanhos (FIGUEREDO et al., 2008), como na reprodução humana (LANGBEEN et al., 2015).

Na espécie bovina, a população total de folículos pré-antrais (FOPA) é variável entre subespécies (*Bos taurus* vs. *Bos indicus*). As fêmeas zebuínas apresentam uma menor reserva de folículos ovarianos (pré-antrais) quando comparado às fêmeas de linhagem taurina (SILVA-SANTOS et al., 2011; YAHYA et al., 2020). Por isso, padronizar a utilização de uma subespécie é importante em estudos relacionados à fisiologia e biotécnicas reprodutivas utilizando o bovino como modelo de estudo para humanos.

Contudo, o cultivo *in vitro* de células ovarianas utiliza estufas em que a concentração de oxigênio (20%) é superior à concentração descrita na literatura como fisiológica do trato reprodutivo *in vivo* (SILVA et al., 2011), o que pode interferir nos resultados dos estudos por levar a um aumento nas espécies reativas de oxigênio (EROs). Por outro lado, as EROs

também são geradas como subprodutos do metabolismo fisiológico, e os antioxidantes são descritos como responsáveis por manter o equilíbrio entre a produção e neutralizar as EROs nos tecidos (WANG et al., 2017). Dessa forma, a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com diferentes antioxidantes é para tentar reverter os danos causados pelas EROs (SILVA et al., 2011).

Entre esses antioxidantes, está o grupo dos Flavonoides. Esse grupo de antioxidantes sequestra radicais livres e consegue quelar íons metálicos (KANDASWAMI; MIDDLETON, 1994). Assim, protegem os tecidos da ação do radical hidroxil (OH) e do ânion superóxido (O₂⁻), que são espécies altamente reativas envolvidas no início da peroxidação lipídica. (GALATI et al., 2002). Porém, o mecanismo exato pelo qual essas e outras substâncias antioxidantes agem no ovário ainda é desconhecido (WANG et al., 2017).

O antioxidante quercetina é um flavonoide (3,5,7,30,40-penta-hidroxi-flavona; MARIANI et al., 2008), e segundo Kang et al (2016), a adição de quercetina e taxifolina apresentaram níveis de EROs significativamente mais baixos que o grupo controle de oócitos suínos durante a maturação. Ainda foi relatado que a quercetina pode preservar as células do *cumulus*, conservar enzimas antioxidantes, como também diminuir as taxas de apoptose através da modulação da expressão dos genes relacionados a apoptose (JIA et al., 2011).

Diversos estudos sobre fatores essenciais ao desenvolvimento folicular vêm sendo realizados. Na literatura consta o primeiro relato de uma prenhez em caprinos a partir do desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários com adição do antioxidante anethol (SÁ et al., 2020). Porém, ainda não há uma descrição na literatura sobre quais requisitos são essencialmente necessários para a saída dos folículos primordiais do estágio de quiescência e posterior desenvolvimento. Várias lacunas precisam ser preenchidas para melhorar a compreensão das características reprodutivas em bovinos assim como em humanos a fim de permitir ajustes no manejo e nas biotécnicas reprodutivas e, conseqüentemente, potencializar o entendimento sobre a folículo-gênese.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações do antioxidante quercetina no cultivo *in situ* de fragmentos de ovário de fêmeas *Bos indicus*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Oogênese

A oogênese abrange uma sequência de eventos que se iniciam com o desenvolvimento e remodelamento das células germinativas primordiais nas fêmeas até a formação do oócito haploide durante a fase embrionária (RUSSE, 1983). O término deste processo ocorre após o nascimento quando o espermatozoide fecundar o oócito (FIGUEREDO et al., 2008). A etapa de formação das células germinativas primordiais até oogônias e o posterior desenvolvimento do oócito apresenta muitas fases: 1) formação das células germinativas primordiais no saco vitelínico; 2) migração para crista gônada; 3) colonização das gônadas; 4) transformação das células germinativas primordiais em oogônias; 5) multiplicação da oogônia; 6) início da meiose; 7) interrupção na fase de diplóteno da prófase na meiose (PALMA et al., 2012); 8) puberdade e retomada da meiose até estágio de metáfase II e 9) fecundação seguido da formação do oócito haploide fecundado (MOORE; PERSAUD, 1994; FIGUEREDO et al., 2008).

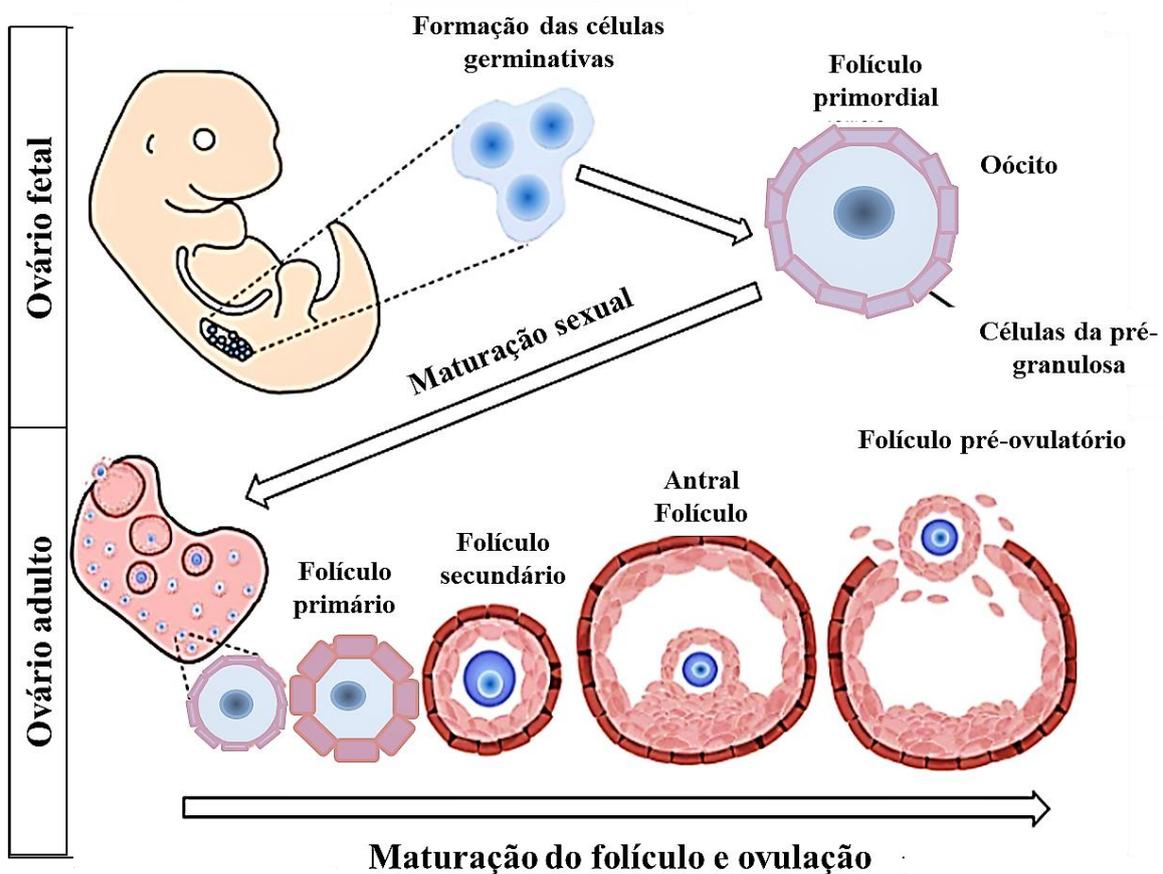
Assim, no início do desenvolvimento embrionário, as células germinativas não estão presentes nas cristas gonadais. O epitélio do saco vitelínico é que abriga as células germinativas primordiais e, posteriormente, ocorre à migração destas células para a região do mesênquima na crista gônada. Na espécie bovina, a migração acontece entre os dias 18 a 31 de gestação (WROBEL; SÜSS, 1998). Ainda, os sinais quimiotáticos produzidos pela crista gônadal são descritos como responsáveis por sinalizar o caminho que as células germinativas primordiais devem percorrer (BUEHR et al. 1993; ANDERSON et al. 1999). Diferentes fatores de transcrição oriundos de células germinativas foram descritos nesse período do desenvolvimento embrionário ao exercer funções importantes relacionadas às células germinativas primordiais. Os fatores BLIMP1 e PRDM14 exercem papel tanto na migração como na proliferação das células germinativas primordiais (OHINATA et al., 2005; YAMAJI et al., 2008), já o OCT4 e NANOG influenciam na sobrevivência dessas células (KEHLER et al., 2004; YAMAGUCHI et al., 2009). Após o deslocamento até as cristas gonadais, as células germinativas primordiais sofrem contínuas divisões mitóticas que culmina na formação da oogônia. De forma simultânea, ocorre à formação de cordões corticais (ou cordões ovígeros) devido às células somáticas do mesoderma circundar a oogônia, e essa estrutura formada será a precursora dos oócitos primordiais (JUENGEL et al., 2002; LISBOA et al., 2015).

Entretanto, o oócito no estágio de imaturo ou primário é formado por células germinativas que se mantem na primeira divisão meiótica (prófase I) até o início da puberdade (Figura 1). O processo de meiose só continua ao atingir a puberdade devido à cascata de eventos pré-ovulatórios desencadeados pelo hormônio luteinizante (LH) e

hormônio folículo estimulante (FSH; FIGUEREDO et al., 2008).

Assim, a retomada da meiose no oócito ocorre passando pelas as fases de metáfase I, anáfase I e telófase I, seguido pela liberação do primeiro corpúsculo polar e formação do oócito secundário. Ao atingir o estágio de metáfase II, a segunda parada da meiose acontece e, na maioria das espécies domésticas, só será retomada se ocorrer à fecundação pelo espermatozoide (BETTERIDGE et al., 1989). O oócito no estágio de metáfase II fecundado pelo espermatozoide continuará a meiose passando pelos estágios de anáfase II e telófase II, seguido pela expulsão do segundo corpúsculo polar (GORDON, 1994). Nesse contexto, a oogênese termina com a formação do oócito haploide fecundado (MOORE; PERSAUD, 1994; FIGUEREDO et al., 2008). Contudo, poucos oócitos que constituem a reserva folicular chegarão a finalizar o desenvolvimento após a fecundação (WASSARMAN, 1988; MARTINS et al., 2008).

Figura 1- Representação esquemática das origens fetais da reserva ovariana.



Fonte: Adaptado de Grive; Freiman (2015).

2.2 Foliculogênese

A folículoogênese e a oogênese ocorrem simultaneamente, e ambas têm início na fase pré-natal na maioria das espécies domésticas (Figura 1; FIGUEIREDO et al., 2008). Contudo, foliculogênese consiste no desenvolvimento fisiológico da ativação, crescimento e maturação do folículo ovariano (FIGUEIREDO et al., 2018). Dessa forma, o início da foliculogênese é marcado pela formação do folículo primordial e termina quando o folículo atinge o estágio de pré-ovulatório (SAUMANDE, 1981).

O folículo primordial é formado por uma camada de células da pré-granulosa com formato achatado e uma lâmina basal que envolve o oócito imaturo, em seguida ocorre o início do período de quiescência ou dormência que é caracterizado pela interrupção da multiplicação das células da granulosa (FIGUEIREDO et al., 2008). Estes folículos primordiais recém-formados vão compor um estoque finito de oócitos que permanecem na fase de quiescência até ocorrer estímulos para crescerem (ERICKSON, 1966). Diversos fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos controlam a foliculogênese (ATWOOD; MEETHALA, 2016; FIGUEIREDO et al., 2018). Sabe-se que em cada onda de crescimento folicular, somente alguns folículos serão ativados (HSUEH et al., 2015; ZHANG; LIU, 2015). Entre os fatores inibitórios da ativação de milhares folículos primordiais descritos na literatura, ou seja, que permitem conservação da reserva ovariana está o PTEN, PDK1, Rps6 ou Foxo3 (JONH et al., 2008; REDDY et al., 2008). Após ocorrer a ativação do folículo primordial, estes irão crescer até ocorrer à ovulação ou entrarão em atresia (MAYER et al., 2004). Porém, aproximadamente 99,9% dos folículos ovarianos em mamíferos serão degenerados através do processo de atresia (FIGUEIREDO et al., 2008).

A reserva folicular está localizada na região superficial do ovário que recebe o nome de cortical. Já a porção interna do ovário, denominada medular, promoverá a sustentação e nutrição do ovário através de tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e terminações nervosas (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

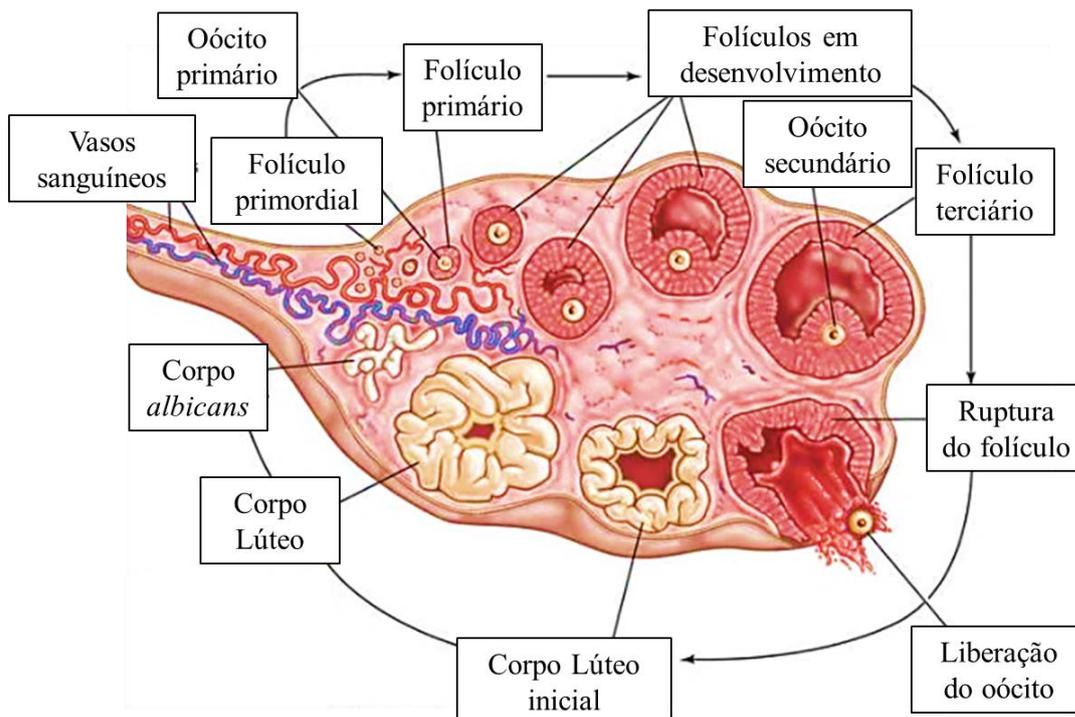
2.3 Classificação dos folículos ovarianos

A importância do folículo na constituição do ovário é grande, visto que este é considerado a unidade morfofuncional encarregada de promover um ambiente ideal para ocorrer à manutenção, viabilidade, crescimento, bem como a maturação do oócito para o momento da ovulação (Figura 1, 2). O folículo é constituído por um oócito envolvido por células somáticas, como as da teca e granulosa (FIGUEIREDO et al., 2008). As alterações

morfológicas durante a foliculogênese são contínuas e modifica a estrutura da parede folicular, células da teca e da granulosa além das alterações no oócito (ARAÚJO et al., 2014). Assim, a classificação folicular é determinada pela morfologia dos folículos em pré-antrais (primordial, primário e secundário) e antrais ou cavitários (terciário e pré-ovulatório; FIGUEIREDO et al., 2008). Os folículos seguindo a classificação anterior podem ser agrupados em primordiais (uma camada de células granulosas achatadas em torno do oócito), e em desenvolvimento (intermediários: uma camada de células granulosas achatadas e cuboides; primários: uma camada de células da granulosa cuboidal e secundários: duas ou mais de células da granulosa cuboides ao redor do oócito; SILVA et al., 2004; FIGUEIREDO et al., 2018).

Ainda os folículos podem ser avaliados segundo a viabilidade em íntegros ou degenerados através da aparência morfológica. Os folículos morfológicamente íntegros apresentam oócito intacto e circundado por células da granulosa organizadas sem a presença de núcleo picnótico. Já os folículos degenerados apresentam uma ou mais características como oócito retraído e/ ou picnótico, bem como células da granulosa desorganizadas e isoladas de membrana basal (SILVA et al., 2004), além de poder apresentar corpos picnóticos nas células da granulosa, baixa quantidade de células ou ruptura da membrana basal (LUCCI et al., 2002).

Figura 2 - Esquema representando o ovário com suas estruturas essenciais durante o crescimento folicular até a ovulação.



Fonte: <https://www.britannica.com/science/ovary-animal-and-human>.

2.3.1 Folículos pré-antrais

A população folicular é constituída por aproximadamente 90% de folículos pré-antrais (SAUMANDE, 1991). Nesse estágio inicial da foliculogênese, considera-se que a regulação do desenvolvimento folicular ocorre pelo controle autócrino e parácrino de diferentes elementos intraovarianos, sendo este composto por fatores de crescimento, citocinas e esteroides gonadais. Entre os fatores de crescimento descritos na literatura vinculados ao desenvolvimento de folículos pré-antrais estão a proteína morfogenética óssea 7 e 15 (BMP 7 e BMP15), fator de diferenciação de crescimento- 9 (GDF9), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1), fator de crescimento de fibroblasto 2 e 10 (FGF2 e FGF10), família de fatores de crescimento transformantes (TGF β), fator inibidor de leucemia (LIF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e fator de crescimento queratinócito (KGF). Já em relação às principais vias de sinalização estudadas e relacionadas aos folículos pré-antrais estão as da adenilato ciclase, MAPK / Erk, PI3K / Akt, fosfolipase C, JAKS / STATS, SMADS (FIGUEREDO et al., 2018) e Hippo (CHEN et al., 2020). Ainda ocorre a expressão de fatores de transcrição específicos dos oócitos que influenciam na ativação folicular (Tabela 1).

Em relação às alterações morfológicas significativas que ocorrem durante o crescimento dos folículos pré-antrais (primordial a secundário) estão a diferenciação e multiplicação das células granulosas para o formato cúbico (GOUGEON, BUSSO, 2000), bem como a ampliação do tamanho oocitário e o citoplasmático (HIRSHFIELD, 1991) e formação da zona pelúcida (FAIR et al. 1997). Outro componente presente desde os folículos pré-antrais são as junções do tipo gap e as projeções transzonais que permitem a comunicação entre os diferentes componentes foliculares fundamentais para o desenvolvimento folicular (BUS et al, 2020).

2.3.1.1 Folículos primordiais

Os folículos primordiais são os menores folículos presentes no ovário, sendo compostos por um oócito circundado por uma camada de células da granulosa achatadas. Essa estrutura também é considerada a unidade reprodutiva do ovário nos mamíferos (ADHIKARI; LIU, 2009; HSUEH et al., 2015). Nesse estágio, o diâmetro do folículo varia entre 30 a 40

µm; já os oócitos apresentam o diâmetro entre 20 a 25 µm (LISBOA et al., 2016). O núcleo é localizado em uma posição central e o nucléolo é evidente. No citoplasma, as organelas estão distribuídas uniformemente ou próximas do núcleo. A organela mais evidente e com formato arredondado é a mitocôndria, já que o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático liso são pouco desenvolvidos, mas também estão espalhadas no citoplasma (LUCCI et al., 2001). Dessa forma, os folículos permanecem com essa estrutura até o início do recrutamento folicular, em que começam a se desenvolver através do processo que recebe o nome ativação do folículo primordial (CHEN et al., 2020).

Quadro 1 – Exemplos de genes expressos e fatores de transcrição específicos relacionados à fase inicial de desenvolvimento folicular.

Nome	Funções	Referência
CITED2 - <i>interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 2</i>	Exerce papel essencial no desenvolvimento embrionário precoce	Combes et al. (2010)
FIGLA - <i>factor in the germline alpha</i>	Atua na formação de folículos primordiais, regulando a expressão dos genes da zona pelúcida	Zhao et al., (2008)
FOXO3 - Fatores <i>Forkhead</i>	Atua na ativação do folículo primordial <i>in vitro</i> é ativado pela via PI3K/AKT	Bromfield; Sheldon (2013)
<i>KIT ligand</i>	Ativação folicular (1), crescimento e sobrevivência do oócito (2), e proliferação das células da granulosa	(1) Parrot; Skinner et al. (1999); (2) Jin et al., (2005); (3) Otsuka; Shimasaki, (2002)
NOBOX - <i>Newborn ovary homeobox gene</i>	Desempenha papel no controle do processo de ativação folicular	Bayne et al. (2015)
SOHLH - <i>spermatogenesis and oogenesis-specific basic hélix-loop-helix</i>	Codifica um regulador transcricional fundamental tanto na oogênese como na espermatogênese	Suzuki et al., (2013)
LIM8 - <i>homeobox 8</i>	Regula ativação folicular e bloqueia a transição do folículo primário para o secundário	Ren et al., (2015)

Fonte: o próprio autor.

2.3.1.2 Folículos primários

Os folículos primários apresentam um oócito envolto por uma camada de células da granulosa cuboides (LUCCI et al, 2001; MARTINS et al., 2008). A zona pelúcida também é formada nessa fase e permanece durante todo desenvolvimento folicular envolvendo o oócito. Na espécie bovina, o diâmetro do folículo é de 40 a 60 μm , enquanto o oócito apresenta o diâmetro entre 30 a 40 μm (LISBOA et al, 2016). Dessa forma, quando o folículo passa do estágio de primordial para primário, ocorre o crescimento tanto do oócito como folículo. Já as mitocôndrias que apresentam o formato arredondado nos folículos primordiais, ao atingir a fase de folículo primário, passam a ter a forma alongada (LUCCI et al, 2001; LISBOA et al., 2016).

2.3.1.3 Folículos secundários

O folículo secundário apresenta duas ou três camadas de células da granulosa cuboides envoltas pela membrana basal, seguido pelas células da teca (BARNETT et al., 2006). Na espécie bovina, o diâmetro dos folículos secundários varia entre 60 a 200 μm (LISBOA et al., 2016). As células da granulosa nesta fase também apresentam muitas junções do tipo gap que permitem a comunicação entre as células da granulosa e o oócito, além da passagem de nutrientes, pequenos metabólitos e íons (KIDDER; MHAWI, 2002).

Alterações no posicionamento dos componentes do folículo primário para secundário também são descritas. O núcleo do oócito passa a ocupar uma posição excêntrica entre a zona pelúcida e o oócito, assim como as organelas se aproximam da periferia do folículo, e o retículo endoplasmático aumenta de tamanho (LISBOA et al., 2016).

2.3.2 Folículos antrais

Os folículos antrais são constituídos pelo folículo terciário e pré-ovulatório. As principais diferenças morfológicas dos folículos antrais em relação aos demais são marcantes devido à presença do líquido folicular e pelo maior número de camadas de células da granulosa (FIGUERDO et al., 2008). Outra diferença em relação aos pré-antrais é que os folículos antrais são dependentes de gonadotrofinas (SALOMON et al., 2018).

Entretanto, os folículos antrais também apresentam diferenças entre terciário e pré-ovulatório. O folículo terciário é formado por um oócito envolto pela zona pelúcida, antro e muitas camadas de células da teca (GORDON, 1994), muitas microvilosidades na zona pelúcida, além de grande quantidade tanto de mitocôndrias arredondadas como alongadas e partículas lipídicas. Já os folículos pré-ovulatórios apresentam mitocôndrias encapsuladas determinando o final do crescimento oocitário nos bovinos, mas o predomínio é de mitocôndrias arredondadas (LISBOA et al., 2016).

O líquido folicular presente na cavidade antral contém diferentes substâncias como água, proteínas séricas, eletrólitos, altas concentrações de hormônios esteroides secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006), além da presença de vesículas extracelulares que são descritas como potenciais facilitadores da comunicação entre as células do folículo e oócito (DA SILVEIRA et al., 2012).

2.4 População ovariana

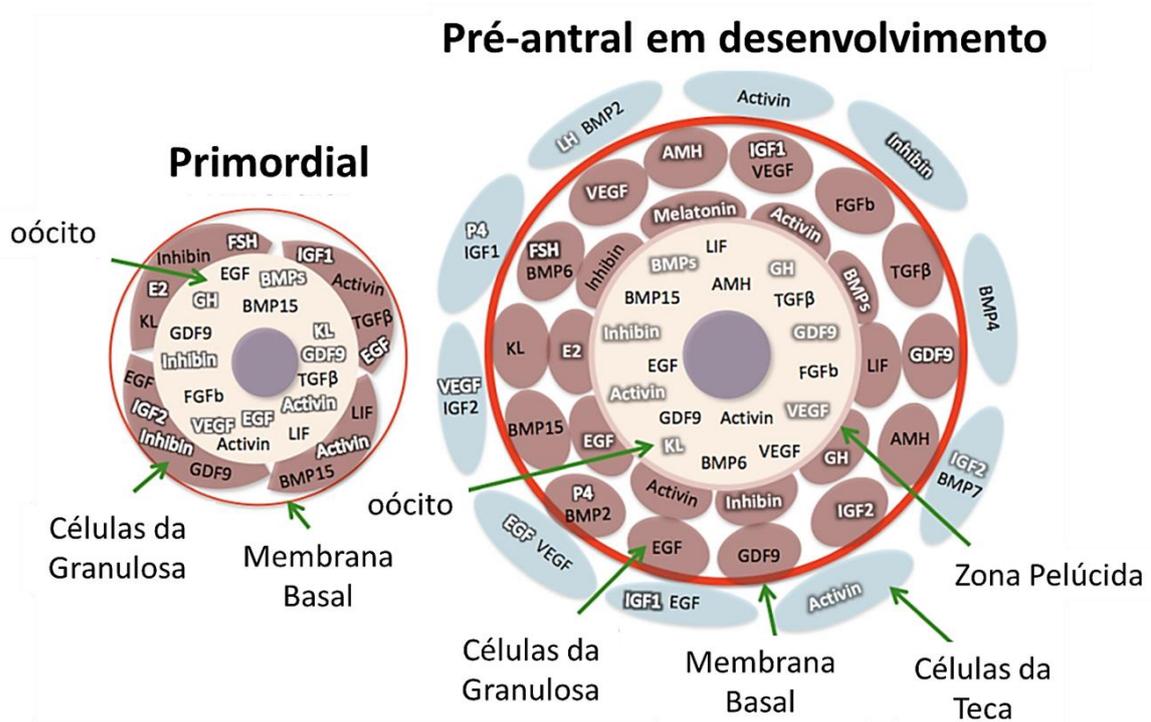
Em bovinos, a população folicular ovariana é composta por aproximadamente 230.000 folículos por ovário ao nascimento (ERICKSON, 1966). Entretanto, o número de folículos presentes no ovário é variável entre indivíduos, bem como a idade, nível hormonal e estado reprodutivo também exercem influência (FIGUEIREDO et al., 2008). Além disso, a raça (YAHYA et al., 2020), a fase do desenvolvimento do animal (SILVA-SANTOS et al., 2011), e a contagem de folículos antrais (CFA) também tem relação com o número de folículos pré-antrais (de VASCONCELOS et al., 2020).

Na espécie bovina, a população de folículos pré-antrais no ovário de fêmeas com diferentes idades e raças (*Bos indicus* e *Bos taurus*) foi de 143.929 e 285.155 folículos em fetos, 76.851 e 109.673 folículos para novilhas, e 39.438 e 89.577 folículos para vacas, respectivamente (SILVA-SANTOS et al., 2011). Já em relação ao número de folículos pré-antrais e a CFA, foi relatado que os ovários de vacas cíclicas, múltíparas e mestiças (*Bos taurus indicus*) com alta CFA tiveram maior número de folículos primordiais e primários degenerados, bem como apresentou uma correlação positiva entre o número de folículos primordiais (degenerados e totais viáveis) com o número de folículos secundários (viáveis e folículos totais; de VASCONCELOS et al., 2020).

2.5. Crescimento, ativação e atresia folicular ovariana

O início do crescimento folicular é marcado pela ativação ou recrutamento do folículo primordial. As células da granulosa passam a alterar o formato de achatado para cúbico, bem como ocorre o aumento da síntese de DNA e a multiplicação celular (FIGUEREDO et al., 2017). Diferentes fatores e hormônios são descritos como chave para o desenvolvimento tanto do oócito como das células foliculares de acordo com o seu tipo celular (Figura 3; FIGUEREDO et al., 2018). Os folículos primordiais ativados entram em um processo de crescimento irreversível, sendo que a maioria entrará em atresia ou morte folicular, e só um vai ovular (CHEN et al., 2020).

Figura 3 – Fatores-chave relacionados ao crescimento e hormônios dentro do folículo primordial e em desenvolvimento de acordo com o compartimento (células do oócito, granulosa e teca) em ruminantes. Ligantes (letra preta em negrito) e receptores (letra branca em negrito). KL – *Kit ligand*; E2 - 17 β -estradiol; FGFb – fator básico de crescimento de fibroblastos; VEGF – fator de crescimento endotelial vascular; GDF-9 – Fator de diferenciação de crescimento-9; LIF – fator inibidor da leucemia; GH - hormônio do crescimento; EGF - fator de crescimento epidérmico; AMH - hormônio antimuleriano; BMP15 - proteína morfogenética óssea 15; BMP6 - Proteína 6 morfogenética óssea; BMP2 - Proteína 2 morfogenética óssea; BMP4 - Proteína 4 morfogenética óssea; IGF1 e IGF2 - Fatores de crescimento da insulina 1 e 2; TGF β - fator de crescimento tumoral beta; BMPs - Morfogenética óssea superfamília de proteínas; FSH - hormônio folículo estimulante; LH - hormônio luteinizante.



Fonte: Figueiredo et al. (2018).

A literatura relata que a via de sinalização PI3K/AKT é fundamental para que ocorra a ativação dos folículos primordiais (KIM; KURITA, 2018; MAIDARTI et al., 2020; CHEN et al., 2020). O inibidor da via de sinalização da PI3K é o PTEN (ANDREA et al., 2016), e estudos demonstraram que os folículos primordiais foram ativados ao utilizar um inibidor de PTEN (MAIDARTI et al., 2019). Ainda, a via de sinalização Hippo também é descrita como importante para a ativação do folículo primordial e, possivelmente, relaciona-se com a via PI3K (MASCIANGELO et al., 2020). Assim, a regulação do processo de crescimento folicular nas fases iniciais (primordial, primário e secundário) é complexa (Figura 3). Diferentes fatores estão relacionados a muitas vias de sinalização que interagem entre si (FIGUEIREDO et al., 2018). Já nos folículos antrais, um mecanismo diferente do que ocorre nos folículos pré-antrais foi relatado. Tal mecanismo refere-se às vesículas extracelulares que foram isoladas do fluido folicular. Na espécie bovina, as vesículas extracelulares podem estimular a proliferação das células da granulosa em bovinos (HUNG et al., 2017).

Contudo, a maior parte dos folículos ovarianos iniciará o processo de atresia, que ocorre através das vias degenerativa e/ou apoptótica. (FIGUEIREDO et al., 2007). Entre as principais causas de atresia devido à degeneração está a isquemia, que é causada pela falta de oxigênio e nutrientes no ovário. Por outro lado, a atresia via apoptose é um mecanismo de morte individual em que ocorre tanto a fragmentação nuclear como a formação de núcleos

apoptóticos (MAGALHÃES et al., 2009). Ainda, a atresia é caracterizada de forma diferente em folículos pré-antrais e antrais. Nos folículos pré-antrais, o oócito apresenta as primeiras alterações como a contração dos oócitos e a fragmentação da cromatina. Já em folículos antrais, as primeiras alterações da atresia ocorrem nas células da granulosa (LISBOA et al., 2016).

2.6. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

A Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Pré-antrais (MOIFOPA) consiste em uma biotécnica reprodutiva com objetivo de utilizar os folículos ovarianos antes de ocorrer atresia, e proporcionar condições ideais para que ocorra o desenvolvimento destes folículos até a maturação. Essa biotécnica também pode ser denominada como ovário artificial e possibilita estudos tanto na área básica como em experimentos toxicológicos (FIGUEREDO et al., 2018).

O primeiro relato de crias nascidas vivas através da biotécnica de MOIFOPA foi em camundongos (O'BRIEN, 2003). Já em ruminantes, Sá et al. (2020) relataram a primeira prenhez em caprinos a partir de folículos inicialmente antrais isolados. Nos ovinos, foi relatado obtenção de oócitos em metafase II (ARUNAKUMARI et al., 2010) e embriões no estágio de mórula após em fertilização *in vitro* (FIV) ou ativação partenogenética de folículos secundários isolados cultivados *in vitro* (ARUNAKUMARI et al., 2010; BARBONI et al., 2011; LUZ et al., 2013). Entretanto, na espécie bovina é descrito apenas a obtenção de folículos primários que se desenvolveram até o estágio antral (SUN; LI, 2013). Para melhorar os resultados a partir dessa biotécnica, diferentes substâncias são adicionadas ao meio e avaliadas com objetivo de estabelecer uma composição ideal que permita o desenvolvimento bem como a viabilidade folicular e oocitária (FIGUEIREDO et al., 2019). Na espécie bovina substâncias como FSH e ativina A (MCLAUGHLIN; TELFER, 2010); FSH e BMP-15 (PASSOS et al., 2013); GDF-9 e bFGF (TANG et al., 2012); FSH, LH, E2, EGF e bFGF (SUN; LI, 2013), VEGF, GH, e IGF-I (ARAÚJO et al., 2014) são exemplos de compostos que já foram utilizados no cultivo *in vitro*.

No entanto, o microambiente que o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos submete essas células pode ser um entrave para o desenvolvimento da biotécnica, já que as concentrações de oxigênio são mais elevadas do que o fisiológico. Essa maior concentração de oxigênio pode desencadear o estresse oxidativo e aumentar as taxas de atresia em decorrência do aumento de EROs apresentar relação com a apoptose celular, apesar de ser

essencial na ovulação (SILVA et al., 2011). Sabe-se que o estresse oxidativo ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de eliminação destas substâncias pelos antioxidantes presentes no tecido. Contudo, as EROs são formadas também como subprodutos do metabolismo celular (RAY et al., 2012). Assim, diferentes antioxidantes são adicionados ao meio de cultivo *in vitro* para tentar melhorar a viabilidade dos folículos.

2.6.1. Antioxidantes aplicados ao cultivo *in vitro*

Os antioxidantes são enzimas ou compostos que neutralizam o excesso de EROs e ajudam a manter o equilíbrio oxidante e antioxidante nos diferentes sistemas do corpo (AGARWAL et al., 2012). As EROs são produzidas em processos de consumo de oxigênio (FUJII et al., 2005) e são constituídas pelos radicais livres e intermediários. Os radicais livres reagem com outras moléculas devido à presença de pelo menos um elétron desemparelhado na camada externa do átomo. Assim, as EROs podem causar danos às células a partir de reações bioquímicas com os diferentes componentes celulares (DNA, membrana lipídica e proteínas). Para minimizar os danos causados aos gametas pelo excesso de EROs no ambiente *in vitro*, os antioxidantes são adicionados ao meio de cultivo (AGARWAL et al., 2012).

O primeiro relato de gestação em cabras a partir do cultivo *in vitro* de folículos antrais iniciais ocorreu com a adição do antioxidante Anetol (de SÁ et al., 2020). Já os antioxidantes que são comumente adicionados ao meio de cultivo são a transferina, selênio e ácido ascórbico em ovinos, apesar da rotina apresentar efeito similar à ação em conjunto desses três antioxidantes (LINS et al., 2017). Outros exemplos de antioxidantes como o ácido ascorbico (THOMAS et al., 2001), ácido alfa lipóico (ZOHEIR et al., 2017), sulforafano (SOHEL et al., 2017) e quercetina (SIROTKIN et al., 2019) foram utilizados no cultivo *in vitro* de células ovarianas de bovinos.

A quercetina é um composto do grupo dos flavonoides (MARIANI et al., 2008). Diferentes efeitos biológicos são atribuídos a quercetina, como anticancerígeno, cardioprotetor, antiviral, antiparasitário e anti-inflamatório (BATIHA et al., 2020). Além desses efeitos, há indícios de que a quercetina pode ser considerada como um agente potencial para atenuar as complicações da síndrome do ovário policístico (TABRIZI et al., 2020). Já em caprinos, a quercetina foi relatada como uma alternativa à cisteína na maturação *in vitro* de oócitos (SILVA et al. 2018).

Nesse sentido, já foi relatada que a grande concentração de quercetina é prejudicial aos oócitos em suínos (KANG et al., 2016). Ainda, a literatura relata a adição da quercetina no

cultivo *in vitro* de células da granulosa isolada em bovinos da subespécie *Bos taurus* em que foram utilizadas diferentes metodologias de análise, e essa substância reduziu o acúmulo de PCNA e *Bax*, além de diminuir a liberação de P4 (SIROTKIN et al., 2019). Contudo, nenhum estudo avaliou o efeito da suplementação da quercetina no cultivo de folículos incluso em tecido ovariano de novilhas da subespécie *Bos indicus* em relação ao estresse oxidativo e a morfologia.

REFERÊNCIAS

- AERTS, J.M.; BOLS, P.E. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.171-9, 2010.
- ADHIKARI, D.; LIU, K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. **Endocrine Reviews**, v. 30, p. 438-64, 2009.
- AGARWAL, A.; APONTE-MELLADO, A.; PREMKUMAR, B.J.; SHAMAN, A.; GUPTA, S. The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. **Reproductive, Biology and Endocrinology**, v.10, p.49, 2012.
- ANDERSON, R.; FASSLER, R.; GEORGES-LABOUESSE, E.; HYNES, R.O.; BADER, B.L.; KREIDBERG, J.A.; SCHAIBLE, K.; HEASMAN, J.; WYLIE, C. Mouse primordial germ cells lacking beta1 integrins enter the germline but fail to migrate normally to the gonads. **Development**, v.126, 1655–1664, 1999.
- ANDREAS, E.; HOELKER, M.; NEUHOFF, C.; THOLEN, E.; SCHELLANDER, K.; TESFAYE D, E.T. A.L. MicroRNA 17–92 cluster regulates proliferation and differentiation of bovine granulosa cells by targeting PTEN and BMP2 genes. **Cell and Tissue Research**, p.1–12, 2016.
- ARAÚJO, V.R.; GASTAL, M.O.; FIGUEIREDO, J.R.; GASTAL, E.L. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology**, v.12, 2014.
- ATWOOD, C.S.; MEETHALA, S.V. The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst implantation. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 430, p.33-48, 2016.
- ARUNAKUMARI, G.; SHANMUGASUNDARAM, N.; RAO, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v.74, p.884-94, 2010.
- BARBONI, B.; RUSSO, V.; CECCONI, S.; CURINI, V.; COLOSIMO, A.; GAROFALO, M.L.A.; CAPACCHIETTI, G.; DI GIACINTO, O.; MATTIOLI, M. In vitro grown sheep preantral follicles yield oocytes with normal nuclear-epigenetic maturation. **PLoS One**, v. 6, 27550, 2011.
- BATIHA, G.E.; BESHBIHY, A.M.; IKRAM, M.; MULLA, Z.S.; EL-HACK, M.E.A.; TAHA, A.E.; ALGAMMAL, A.M.; ELEWA, Y.H.A. The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. **Foods**, v.9, p.374, 2020.
- BARNETT, K.R.; SCHILLING, C.C.R.; GREENFELD, C.R.; TOMIC, D.; FLAWS, J.A. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reproduction**, v.10, p.1-19, 2006.
- BAYNE, R. A., KINNELL, H. L., COUTTS, S. M., HE, J.; CHILDS, A. J., AND ANDERSON, R. A. GDF9 is transiently expressed in oocytes before follicle formation in the

human fetal ovary and is regulated by a novel NOBOX transcript. **PLoS One**, v. 10, p.0119819, 2015.

BETTERIDGE, K.J.; SMITH, C.; STUBBINGS, R.B.; XU, K.P.; KING, W.A. Potential genetic improvement of cattle by fertilization of fetal oocytes *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.38, p.87-98, 1989.

BIZARRO-SILVA, C.; SANTOS, M.M.; GEREZ, J.R.; GONZÁLEZ, S.M.; LISBOA, L.A.; SENEDA, M.M. Influence of follicle-stimulating hormone concentrations on the integrity and development of bovine follicles cultured. **Zygote**. v.26, p.1 - 7, 2018.

BUS, A.; SZYMANSKA, K.; PINTELON, I.; LEROY, J.L.M.R.; BOLS, P.E.J. Preservation of connexin 43 and transzonal projections in isolated bovine pre-antral follicles before and following vitrification. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2020.

BROMFIELD, J.J.; SHELDON, I.M. Lipopolysaccharide reduces the primordial follicle pool in the bovine ovarian cortex *ex vivo* and in the murine ovary *in vivo*. **Biology of Reproduction**, v.88, p.98, 2013.

BUEHR, M.; MCLAREN, A.; BARTLEY, A.; DARLING, S. Proliferation and migration of primordial germ cells in *We/We* mouse embryos. **Developmental Dynamics**, v.198, p.182–189, 1993.

CHEN, Y.; YANG, W.; SHI, X.; ZHANG, C.; SONG, G.; HUANG, D. The Factors and Pathways Regulating the Activation of Mammalian Primordial Follicles *in vivo*. **Frontiers in cell and developmental biology**, v.8, p.575706, 2020.

COMBES, A.N.; SPILLER, C.M.; HARLEY, V.R.; SINCLAIR, A.H.; DUNWOODIE, S.L.; WILHELM, D.; KOOPMAN, P. Gonadal defects in *Cited2*-mutant mice indicate a role for SF1 in both testis and ovary differentiation. **The International Journal of Developmental Biology**; v.54, p.683-9, 2010.

da SILVEIRA, J.C.; VEERAMACHANENI, D.N.; WINGER, Q.A.; CARNEVALE, E.M.; BOUMA, G.J. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, v.86, p.71, 2012.

DE VASCONCELOS, G. L.; MACULAN, R.; DA CUNHA, E. V.; SILVA, A. W. B.; BATISTA, A. L. S.; DONATO, M. A. M.; PEIXOTO, C. A.; SILVA, J.R.V.; DE SOUZA, J. C. Antral follicular count and its relationship with ovarian volume, preantral follicle population and survival, oocyte meiotic progression and ultrastructure of *in vitro* matured bovine cumulus–oocyte complexes. **Zygote**, v.28, p.1–9, 2020.

ERICKSON, B.H. Development and senescence of the post natal bovine ovary. **Journal of Animal Science**, v.25, p.800–805, 1966.

FAIR, T.; HULSHOF, S.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Oocyte ultrastructure in bovine primordial to early tertiary follicles. **Anatomy and Embryology**, v.195, p.327–36, 1997.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: GONÇALVES P.B.D., FIGUEIREDO J.R., FREITAS V.J.F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. ed. 2. São Paulo: Roca, 2008, p.303–327.

FIGUEIREDO, J.R.; LIMA, L.F.; SILVA, J.R.; SANTOS, R.R. Control of growth and development of preantral follicle: insights from in vitro culture. **Animal Reproduction**, v.15, p.648-659, 2018.

FIGUEIREDO, J. R.; CADENAS, J. ; LIMA, L. F.; SANTOS, R. R. Advances in vitro folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal Reproduction**, v. 16, p. 52-65, 2019.

FINDLAY, J.K.; DRUMMOND, A.E.; DYSON, M.L.; BAILLIE, A.J.; ROBERTSON, D.M.; ETHIER, J.F. Recruitment and development of the follicle; the roles of the transforming growth factor-beta superfamily. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, p.35-43, 2002

FUJII, J.; IUCHI, Y.; OKADA, F. Fundamental roles of reactive oxygen species and protective mechanisms in the female reproductive system. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.3, p.43, 2005.

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J.X.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, p.91-104, 2002.

GRIVE, K.J.; FREIMAN, R.N. The developmental origins of the mammalian ovarian reserve. **Development**, v.142, p.2554-2563, 2015.

GORDON, I. **Laboratory production of cattle embryos**. 1st ed. Cambridge: CAB International: Raven Press, 1994.

GOUGEON, A., BUSSO, D. Morphologic and functional determinants of primordial and primary follicles in the monkey ovary. **Molecular Cellular and Endocrinology**, v. 163, p.33-42, 2000.

HAFEZ, B., HAFEZ, E. S. E. Anatomia da reprodução feminina. In: HAFEZ, E. S. E. Reprodução animal. São Paulo: Manole, 7 ed., p. 261-278, 2004.

HIRSHFIELD, A. N. Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology**, v.124, p.43-101, 1991.

HSUEH, A. J.; KAWAMURA, K.; CHENG, Y.; FAUSER, B. C. Intraovarian control of early folliculogenesis. **Endocrinology**, Rev. 36, 1–24, 2015.

HUNG, W.T.; NAVAKANITWORAKUL, R.; KHAN, T.; ZHANG, P.; DAVIS, J.S.; MCGINNIS, L.K.; CHRISTENSON, L.K. Stage-specific follicular extracellular vesicle uptake and regulation of bovine granulosa cell proliferation. **Biology of Reproduction**, v, 97, p.644-655, 2017.

KEHLER, J.; TOLKUNOVA, E.; KOSCHORZ, B.; PESCE, M.; GENTILE, L.; BOIANI, M.; LOMELÍ, H.; NAGY, A.; MCLAUGHLIN, K.J.; SCHÖLER, H.R.; TOMILIN, A. Oct4 is required for primordial germ cell survival. **EMBO Reports**, v.5, p.1078-83, 2004.

KIDDER, G.M.; MHAWI, A.A. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. **Reproduction**, v.123, p.613, 2002.

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

JIN, X.; HAN, C.S.; YU, F.Q.; WEI, P.; HU, Z.Y., LIU, Y.X. Anti-apoptotic action of stem cell factor on oocytes in primordial follicles and its signal transduction. **Molecular Reproduction and Development**, v.70, p.82-90, 2005.

JUENGL, J.L.; SAWYER, H.R.; SMITH, P.R.; QUIRKE, L.D.; HEATH, D.A.; LUN, S.; WAKEFIELD, S.J.; MCNATTY, K.P. Origins of follicular cells and ontogeny of steroidogenesis in ovine fetal ovaries. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.191, p.1-10, 2002.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 366, p. 351-376, 1994.

KIM, S.Y.; KURITA, T. New Insights on the Role of Phosphoinositide 3-Kinase Activity in the Physiology of Immature Oocytes: Lessons from Recent Mouse Model Studies. **European Medical Journal Reproductive Health**, v.3, p. 119-125, 2018.

JOHN, G.B.; GALLARDO, T.D.; SHIRLEY, L.J.; CASTRILLON, D.H. Foxo3 is a PI3K dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Developmental Biology**, v.321, p.197-204, 2008.

LANGBEEN, A.; DE PORTE, H. F.M.; BARTHOLOMEUS,E.; LEROY, J. L.M.R.; BOLS, P.E.J. Bovine in vitro reproduction models can contribute to the development of (female) fertility preservation strategies. **Theriogenology**, v.84, p. 477-489, 2015.

LISBOA, L.A.; SILVA, C.B.; GONZÁLEZ, S.M.; BÚFALO, I.; SENEDA, M.M. *In vitro* culture of preantral follicles. In: SENEDA, M.M.; SILVA-SANTOS, K.C. MARINHO, L.S.R. **Biotechnology of Animal Reproduction**. ed. 1. Hauppauge, New York: Nova Science Publisher's, 2015, p.272–292.

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.S.; MATOS, M.H.T. Rutin can replace the use of three other antioxidants in the culture medium, maintaining the viability of sheep isolated secondary follicles. **Theriogenology**, v.89, p.263-270, 2017.

LUCCI, C.M.; SILVA, R.V.; CARVALHO, C.A.; FIGUEIREDO, R.; BÁO, N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Ruminant Research**, v. 41, p. 61–69, 2001.

- LUCCI, C.M.; RUMPF, R.; FIGUEIREDO, J.R.; BÁO, S.N. Zebu (*Bos indicus*) ovarian preantral follicles: morphological characterization and development of an efficient isolation method. **Theriogenology**, v. 57, pp. 1467-1483, 2002.
- MAIDARTI, M.; ANDERSON, R.A.; TELFER, E.E. Crosstalk between PTEN/PI3K/Akt Signalling and DNA Damage in the Oocyte: Implications for Primordial Follicle Activation, Oocyte Quality and Ageing. **Cells**, v. 9, p.200, 2020.
- MAGALHÃES, D.M.; FERNANDES, D.D.; ARAUJO, V.R.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese in vivo e in vitro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, n.4, p.171-182, 2009.
- MAKAREVICH, A.V.; FÖLDEŠIOVÁ, M.; PIVKO, J.; KUBOVIČOVÁ, E.; CHRENEK, P. Histological characteristics of ovarian follicle atresia in dairy cows with different milk production. **Anatomy, Histology, Embryology**, v.47, p.510-516, 2018.
- MARIANI, C.; BRACA, A., VITALINI, S.; TOMMASI, N.D.E.; VISIOLI, F.; FICO, G. Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae). **Phytochemistry**, v.69, p. 6. 2008.
- MARTINS, F.S.; SILVA, J. R. V. RODRIGUES, A. P. R; FIGUEIREDO, J.R. Fatores reguladores da foliculogênese em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.1, p.36-49, 2008.
- MASCIANGELO, R.; HOSSAY, C.; CHITI, M.C.; MANAVELLA, D.D.; AMORIM, C.A.; DONNEZ, J.; DOLMANS, M.M. Role of the PI3K and Hippo pathways in follicle activation after grafting of human ovarian tissue. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**, v.37, p.101-108, 2020.
- MAYER L.P.; DEVINE P.J.; DYER C.A. et al. The follicle depletes mouse ovary produces androgen. **Biology of Reproduction**. v.71, p.130-138, 2004.
- MCLAUGHLIN, M.; TELFER, E.E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. **Reproduction**, v. 139, p.971-8, 2010.
- MORITA, Y.; TILLY, J.L. Oocyte Apoptosis: Like Sand through an Hourglass. **Developmental Biology**, v. 213, p. 1-17, 1999.
- MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V. Início do desenvolvimento humano. In: Moore, K.L., Persaud, T.V.N. Embriologia clínica. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994. p.13-38.
- NEVES, M. M.; MARQUES-Jr, A. P. Senescência reprodutiva feminina em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.2, p.133-140, 2008.
- OHINATA, Y.; PAYER, B.; O'CARROLL, D.; ANCELIN K, ONO,Y.; SANO, M.; BARTON, S.C.; OBUKHANYCH, T.; NUSSENZWEIG, M.; TARAKHOVSKY, A.; SAITOU, M.; SURANI, M.A. Blimp1 is a critical determinant of the germ cell lineage in mice. **Nature**, v.436, p.207-13, 2005.

O'BRIEN, M.J.A. Revised protocol for in vitro development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. **Biology of Reproduction**, v.68, n.5, p.1682–1686, 2003.

RAY, P.D.; HUANG, B.W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v.24, p.981-90, 2012.

REDDY, P.; LIU, L.; ADHIKARI, D.; JAGARLAMUDI, K.; RAJAREDDY, S.; SHEN, Y.; DU, C.; TANG, W.; HÄMÄLÄINEN, T.; PENG, S.L.; LAN, Z-J.; COONEY, A.J.; HUHTANIEMI, I.; LIU, K. Oocyte-specific deletion of PTEN causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v.319, p.611-613, 2008.

REN, Y., SUZUKI, H., JAGARLAMUDI, K., GOLNOSKI, K., MCGUIRE, M., LOPES, R., PACHNIS, V.; RAJKOVIC, A. Lhx8 regulates primordial follicle activation and postnatal folliculogenesis. **BMC Biology**, v. 13, p.39, 2015.

RUSSE, I. Oogenesis in cattle and sheep. **Bibliotheca Anatomica**, v.24, p.77-92, 1983.

SÁ, N.A.R.; FERREIRA, A.C.A.; SOUSA, F.G.C.; DUARTE, A.B.G.; PAES, V.M.; CADENAS, J.; ANJOS, J.C.; FERNANDES, C.C.L.; ROSSETO, R.; CIBIN, F.W.S.; ALVES, B.G.; RODRIGUES, A.P.R.; RONDINA, D.; GASTAL, E.L.; FIGUEIREDO, J.R. First pregnancy after in vitro culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. **Molecular Reproduction and Development**, v.87, p.966-977, 2020.

SALOMON, A.K.; LEON, K.; CAMPBELL, M.M.; YOUNG, K.A. Folliculogenic factors in photo regressed ovaries: Differences in mRNA expression in early compared to late follicle development. **General and Comparative Endocrinology**, v.260 p.90–99, 2018.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.157, p.29-38, 1981.

SAUMANDE, J. La folliculogenèse chez les ruminants. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.167, p.205-218, 1991.

DE SÁ, N.A.R.; FERREIRA, A.C.A.; SOUSA, F.G.C.; DUARTE, A.B.G.; PAES, V.M.; CADENAS, J.; ANJOS, J.C.; FERNANDES, C.C.L.; ROSSETO R, CIBIN FWS, ALVES BG, RODRIGUES APR, RONDINA D, GASTAL EL, FIGUEIREDO, J.R. First pregnancy after in vitro culture of early antral follicles in goats: Positive effects of anethole on follicle development and steroidogenesis. **Molecular Reproduction Development**, v.7, p.966-977, 2020,

SILVA, J.R.V.; VAN DEN HURK, R.; MATOS, M.H.T.; SANTOS, R.R.; PESSOA, C.; MORAES, M.O.; FIGUEIREDO, J.R. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v.61, p.1691-1704, 2004.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R; DUARTE, A.B.G.; LOPES, C.A.P., FIGUEIREDO, J.R. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. **Revista Brasileira de**

Reprodução Animal, v.35, n.3, p.315-326, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.G.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M.F.; ANDRADE, E.R.; RUBIN, M.I.B.; STURION, L.; STERZA, F.A.M.; SENEDA, M.M. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* females. **Theriogenology**, v.76, p.1051-1057, 2011.

SIROTKIN, A.V.; HRABOVSKÁ, S.; ŠTOCHMAĽOVÁ, A.; GROSSMANN, R.; ALWASEL, S.; HALIM HARRATH, A. Effect of quercetin on ovarian cells of pigs and cattle. **Animal Reproduction Science**, v.205, p.44-51, 2019.

SMITH, P.; WILHELM, D.; RODGERS, R.J. Development of mammalian ovary. **Journal of Endocrinology**, v.221, p.145-161, 2014.

SOHEL, M.M.H.; KONCA, Y.; AKYUZ, B.; ARSLAN, K.; SARIOZKAN, S.; CINAR, M.U. Concentration dependent antioxidative and apoptotic effects of sulforaphane on bovine granulosa cells in vitro. **Theriogenology**, v.97, p.17-26, 2017.

SUN, X., SU, Y., HE, Y., ZHANG, J., LIU, W., ZHANG, H.; HOU, Z.; LIU, J.; LI, J. New strategy for in vitro activation of primordial follicles with mTOR and PI3K stimulators. **Cell Cycle**, v.14, p. 721–731, 2015.

SUN, J.; LI, X. Growth and antrum formation of bovine primary follicles in long-term culture in vitro. **Reproduction of Biology**, v.13, p.221-228, 2013.

PALMA, G.A.; ARGAÑARAZ, M.E.; BARRERA, A.D.; RODLER, D.; MUTTO, A.Á.; SINOWATZ, F. Biology and biotechnology of follicle development. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p.938138, 2012.

PARROT, J.A.; SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v.140, n.9, p.4262-4271, 1999.

PASSOS, M.J.; VASCONCELOS, G.L.; SILVA, A.W.B.; BRITO, I.R.; SARAIVA, M.V.A.; MAGALHÃES, D.M.; COSTA, J.J.N.; DONATO, M.A.M.; RIBEIRO, R.P.; CUNHA, E.V.; PEIXOTO, C.A.; CAMPELLO, C.C.; FIGUEIREDO, J.R.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Accelerated growth of bovine preantral follicles in vitro after stimulation with both FSH and BMP-15 is accompanied by ultrastructural changes and increased atresia. **Theriogenology**, v.79, p.1269-1277, 2013.

TABRIZI F. P. F.; HAJIZADEH-SHARAFABAD, F.; VAEZI, M.; JAFARI-VAYGHAN, H.; ALIZADEH, M.; MALEKI, V. Quercetin and polycystic ovary syndrome, current evidence and future directions: a systematic review. **Journal of Ovarian Research**, v.13, p.11, 2020.

TANG, K.; YANG, W.; LI, X.; W U, C.J.; SANG, L.; YANG, L. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. **Animal Reproduction Science**, v.131, p.129-134, 2012.

THOMAS, F.H.; LEASK, R.; SRSEN, V.; RILEY, S.C.; SPEARS, N.; TELFER, E.E. Effect of ascorbic acid on health and morphology of bovine preantral follicles during long-term culture. **Reproduction**, v.122, p.487-495, 2001.

WANG, S.; HE, G.; CHEN, M.; ZUO, T.; XU, W.; LIU, X. The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v.2017, p.1-14, 2017.

WASSARMAN, P.M. The mammalian ovum. In, p. KNOBIL, E.; NEILL, J. The Physiology of Reproduction. Raven Press, New York, p.69-101, 1988.

WROBEL, K.H.; SÜSS, F. Identification and temporospatial distribution of bovine primordial germ cells prior to gonadal sexual differentiation. **Anatomy and Embryology**, v.197, p.451-67, 1998.

YAHYA, N. F. A.; DAUD, N. H. A.; ABDULLAH, P.; KHANDOKER, M. A. MD. Y. Comparison of Cow's Breed on the Morphology of Ovaries Collected from Abattoir. **Transactions on Science and Technology**, v. 7, ed. 2, p.58 - 63, 2020.

YAMAJI, M.; SEKI, Y.; KURIMOTO, K.; YABUTA, Y.; YUASA, M.; SHIGETA, M.; YAMANAKA, K.; OHINATA, Y.; SAITOU, M. Critical function of Prdm14 for the establishment of the germ cell lineage in mice. **Nature Genetics**, v.40, p.1016-22, 2008.

YAMAGUCHI, S.; KURIMOTO, K.; YABUTA, Y.; SASAKI, H.; NAKATSUJI, N.; SAITOU, M.; TADA, T. Conditional knockdown of Nanog induces apoptotic cell death in mouse migrating primordial germ cells. **Development**, v.136, p. 4011-4020, 2009.

ZHAO, H.; CHEN, Z.J.; QIN, Y.; SHI, Y.; WANG, S.; CHOI, Y.; SIMPSON, J.L.; RAJKOVIC, A. Transcription factor FIGLA is mutated in patients with premature ovarian failure. **American Journal of Human Genetics**, v.82, p.1342-1348.

ZHANG, H.; LIU, K. Cellular and molecular regulation of the activation of mammalian primordial follicles: somatic cells initiate follicle activation in adulthood. **Human Reproduction**, v.21, p.779-786, 2015.

ZOHEIR, K.M.; HARISA, G.I.; ALLAM, A.A.; YANG, L.; LI, X.; LIANG, A.; ABD-RABOU, A.A.; HARRATH, A.H. Effect of alpha lipoic acid on in vitro development of bovine secondary preantral follicles. **Theriogenology**, v.88, p.124-130, 2017.

3. HIPÓTESE

A adição de quercetina ao meio de cultivo *in vitro* promove a manutenção da integridade, o desenvolvimento e estimula a ação antioxidante em folículos pré-antrais na espécie bovina.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações do antioxidante quercetina no cultivo *in situ* de fragmentos de ovário de fêmeas *Bos taurus indicus*.

4.2 Objetivos específicos

- Estabelecer a melhor concentração de quercetina (10, 25 e 50 µg/mL) considerando a fatores como integridade e desenvolvimento durante o cultivo *in situ* por 5 ou 10 dias;
- Determinar o potencial antioxidante no cultivo de fragmentos de tecido ovariano bovino após cultivo *in situ* contendo meio suplementando com quercetina

5. ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO

“Impacto do antioxidante quercetina sobre a integridade morfológica e desenvolvimento folicular no cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos de fêmeas *Bos indicus* sobre suporte de gel de agarose”

INTRODUÇÃO

O cultivo de fragmentos do córtex ovariano (*in situ*) é uma biotécnica de reprodução assistida que possibilita o cultivo de folículos pré-antrais (FIGUEREDO et al., 2008). Essa metodologia apresenta vantagens em relação às demais metodologias de cultivo folicular devido à facilidade de execução e ao menor tempo em obter os fragmentos com folículos inclusos, já que não é necessário isolá-los. Além disso, fornece um suporte adequado para que o folículo incluso no tecido mantenha sua estrutura tridimensional, não prejudicando a organização folicular e conservando a união das células foliculares com o estroma ovariano (ABIR et al., 2006; ROSSETTO et al., 2011).

Diversos estudos têm avaliado a suplementação do meio de cultivo *in vitro* com diferentes concentrações de hormônios (FSH - MAX et al., 2017; BIZARRO-SILVA et al., 2018), fatores de crescimento (EGF-MAX et al., 2018) e antioxidantes (ácido ascórbico - GOMES et al., 2015; ácido alfa-lipóico - GOMES et al., 2018) para compreender os efeitos da adição dessas substâncias no desenvolvimento e viabilidade de folículos ovarianos tanto em bovinos quanto equinos. Entretanto, o ambiente *in vitro* não apresenta quantidades de antioxidantes similares ao que é encontrado *in vivo*, e expõe os gametas a um excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs; GAD et al., 2010). Esse aumento na produção de EROs ocorre devido ao microambiente *in vitro* apresentar concentrações de oxigênio mais elevadas do que é relatado *in vivo* (LUVONI et al., 1996). Dessa forma, o excesso de EROs pode causar danos às estruturas celulares (membranas lipídicas, DNA, proteínas; AGARWAL et al., 2012), e diminuir a qualidade oocitária induzindo a apoptose (TAMURA et al., 2008).

Nesse contexto, uma das formas de proteger as células contra os danos causados pelas EROs é a adição de antioxidantes, os quais têm apresentado efeitos favoráveis quando adicionados aos sistemas de cultivo *in vitro* (SILVA et al., 2011). Entre as classificações de antioxidantes, está o grupo dos flavonoides, os quais sequestram radicais livres e conseguem quelar íons metálicos (KANDASWAMI e MIDDLETON, 1994), protegendo os tecidos da ação do radical hidroxil (OH) e do ânion superóxido

(O2-), que são espécies altamente reativas envolvidas no início da peroxidação lipídica (GALATI et al., 2002).

A quercetina (3,5,7,30,40-penta-hidroxi-flavona) é um flavonoide com diversas ações biológicas (MARIANI et al., 2008; BATIHA et al., 2020). O estudo de Sirotkin e colaboradores (2019) foi o primeiro a sugerir que a ação da quercetina nas células ovarianas em relação com proliferação, apoptose e liberação de hormônios e essa atividade pode ser espécie específica. Outro estudo de Kang et al. (2016) descreve que a adição de quercetina diminuiu significativamente os níveis de EROs ao compará-lo com o grupo controle de oócitos suínos maduros. No entanto, ainda não é possível determinar a ação e doses adequadas da quercetina no cultivo de folículos ovarianos da fêmea bovina. Dessa forma, a hipótese do presente estudo baseia-se na suplementação do meio de cultivo *in vitro* com quercetina, de forma que seu efeito antioxidante promova o crescimento e a manutenção da integridade dos folículos inclusos em tecido ovariano bovino. Assim, objetivou-se avaliar o efeito da adição de diferentes concentrações do antioxidante quercetina no cultivo *in vitro* de folículos inclusos em tecido ovariano de fêmeas *Bos indicus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e transporte dos ovários

Para este estudo foram realizadas duas repetições, uma destinada para análise histológica e outra para análise do potencial antioxidante. Em cada análise foram utilizados seis pares de ovários (n = 12) provenientes de novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade média de 24 meses e escore de condição corporal entre 3 e 4 (escala de 1 a 5; LOWMAN; SCOTT; SOMERVILLE, 1976). No abatedouro, os ovários foram lavados com solução de cloreto de sódio 0,9% e realizou-se a fragmentação do tecido ovariano. Para cada animal um fragmento foi selecionado aleatoriamente e imediatamente fixado em Bouin (grupo controle, não cultivado D0) quando a repetição foi realizada para análise histológica. Já quando a repetição foi realizada para análise do potencial antioxidante, um fragmento foi separado em microtubos, transportado ao laboratório a 4° C, e congelado à -80°C (grupo controle EROs) ao chegar ao laboratório. Fragmentos contendo folículos antrais e corpos lúteos foram excluídos do estudo. Os demais fragmentos ovarianos foram depositados em

microtubos com meio essencial mínimo (MEM; Gibco BRL, Rockville, MD, EUA; osmolaridade 300 mOsm/L, pH 7,2) suplementado com penicilina 100 µg/mL e estreptomicina 100 µg/mL) para o transporte até o laboratório em condições de temperatura controlada (4°C; aproximadamente 45 km).

Preparo do Gel de Agarose

O gel de agarose foi obtido a partir da solução contendo 1,5% de Agarose (Agarose Molecular Biology Grade; Kasvi, Brasil) em água destilada. Posteriormente, esse gel foi autoclavado e dividido, com auxílio de bisturi e pinça estéril em suportes com dimensões de 1 cm³, os quais foram acondicionados em placas de 24 poços (Adaptado de SILVA et al., 2017).

Cultivo in vitro de folículos pré-antrais

Os fragmentos foram cultivados em 1 mL do MEM suplementado com quercetina nas concentrações de 0, 10, 25, 50 µg/mL, depositado em placas de cultivo de 24 poços com o suporte de gel de agarose. O meio de cultivo foi o MEM com suplemento de ITS (6,25 µg/mL insulina, 6,25 mg/mL transferrina e 6,25 ng/mL selênio), 0,23 mM de piruvato, 2 mM glutamina, 2 mM hipoxantina, 1,25 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA Gibco BRL, Rockville, MD, USA), 20 UI/mL de penicilina e 200 mg/mL de estreptomicina (SILVA et al., 2017). Após o preparo do meio, as placas foram cultivadas durante 5 ou 10 dias, com um fragmento de tecido ovariano por tratamento, sob as mesmas condições de temperatura (38,5°C), atmosfera (5% de CO₂) e umidade saturada. Os meios frescos foram preparados e equilibrados durante 1 hora antes do uso em estufa, e a troca foi realizada em dias alternados.

Delineamento experimental

Após a fragmentação ovariana (n = 9) e retirada de um fragmento para o grupo controle não cultivado, os oito fragmentos restantes foram randomicamente distribuído entre grupo controle cultivado (MEM) e três concentrações diferentes de suplementação de quercetina: MEM suplementado com 10 µg/mL de quercetina (Q10), MEM suplementado com 25 µg/mL de quercetina (Q25) e MEM suplementado com 50 µg/mL

de quercetina (Q50; Figura 1), durante cultivos de 5 (D5) ou 10 (D10) dias, conforme estabelecidas previamente (KANG et al., 2016). Foram realizadas duas repetições para obter amostras de tecido ovariano para avaliação histológica e para análise do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP).

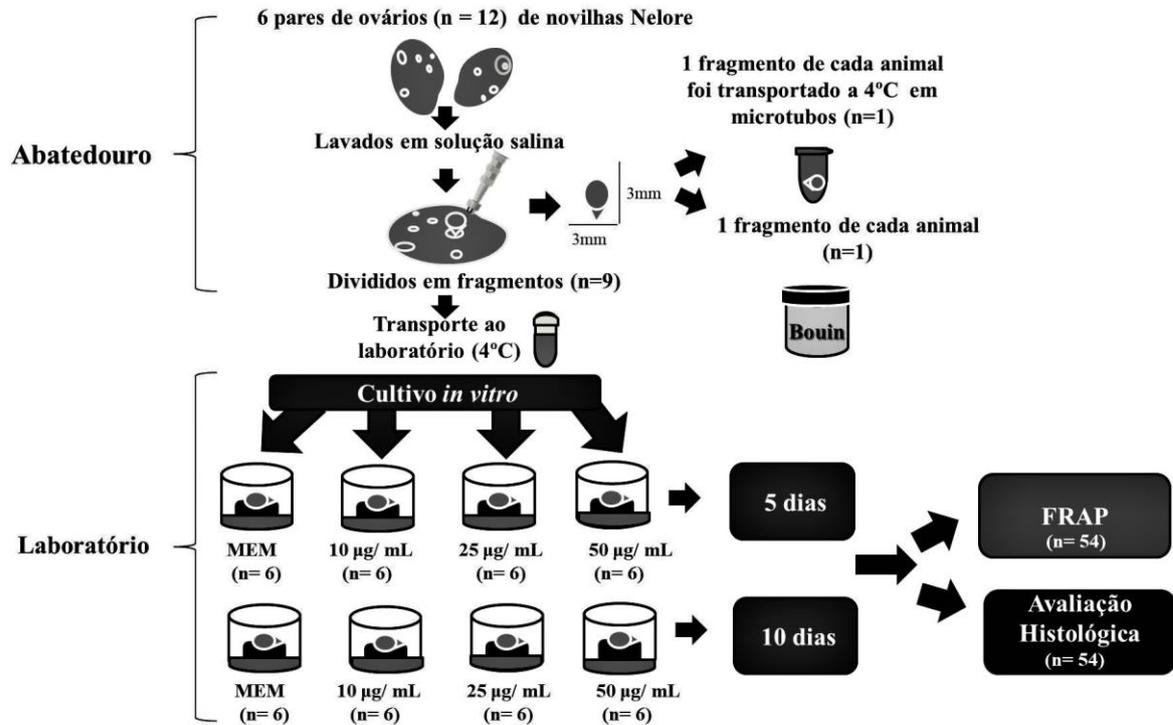


Figura 1. Delineamento experimental utilizado para cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos em meio controle (Meio essencial mínimo - MEM) suplementado com diferentes concentrações de quercetina (0, 10, 25 e 50 µg/mL).

Processamento histológico

Para a análise da morfologia dos folículos ovarianos, os fragmentos do córtex ovariano (controle não cultivado e cultivados durante 5 ou 10 dias de cultivo *in vitro*) foram fixados por imersão em Bouin durante 24 horas e após este período, mantidos em álcool 70%. Após a fixação, os tecidos foram desidratados em série graduada de soluções crescentes de etanol, diafanizados em xilol, embebidos em parafina para posterior confecção de cortes histológicos. Na sequência, cada fragmento foi seccionado a uma espessura de 5 µm em micrótomato rotativo (Leica®, Wetzlar-Alemanha), sendo que para montagem das lâminas de microscopia de luz, utilizou-se o intervalo de 5 secções, a fim de evitar a contagem do mesmo folículo durante a leitura. As lâminas

foram coradas com Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Hematoxilina, e a leitura das lâminas foram realizadas por um único avaliador.

Classificação e análise da integridade folicular

Os folículos pré-antrais foram classificados de acordo com o estágio de desenvolvimento em primordial (uma única camada de células granulosas achatadas ao redor do oócito), primários (uma única camada de células da granulosa cuboidal ao redor do oócito) ou secundários (oócito rodeado por mais de uma camada de células da granulosa cuboidal completa) (CARÁMBULA et al, 1999). Em relação avaliação da integridade, folículos degenerados foram considerados quando apresentavam pelo menos uma das seguintes características: núcleo do oócito condensado, oócito encolhido, corpos picnóticos nas células da granulosa, baixa densidade celular ou ruptura da membrana basal (SILVA-SANTOS et al, 2011). Apenas folículos que apresentavam núcleo foram contados.

Ensaio antioxidante do poder de redução do ferro (FRAP)

Os fragmentos ovarianos foram congelados em microtubos à -80°C nos dias 0, 5 e 10 do cultivo *in vitro* para processamento posterior. Apenas no dia do processamento as amostras foram descongeladas para avaliação do potencial antioxidante através da habilidade da redução do ferro (FRAP). Nessa análise o complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) é reduzido ao complexo ferroso (FeII-TPZ), na presença de um antioxidante (Trolox), o que resulta na alteração colorimétrica da solução (BENZIE; STRAINS, 1996). Os fragmentos ovarianos foram homogeneizados em tampão KCl para posterior centrifugação (1500 rpm x 10 min x 4°C). O sobrenadante foi utilizado para o teste de FRAP. As amostras foram incubadas (37 ° C, 30 min) com 150 µL de reagente FRAP e lidas a 595 nm (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finlândia). Uma curva Trolox padrão (0,02-20 nmol) foi usada para equalizar o teste FRAP. Os resultados são apresentados como nanomoles de equivalente Trolox/miligramma de proteína conforme a adaptação de Lourenco-Gonzalez et al. (2019).

Análise Estatística

A proporção de folículos íntegros foi estabelecida a partir da quantidade total de folículos avaliados (íntegros e degenerados). A proporção de folículos primordiais e em desenvolvimento (primário e secundário) foi estabelecida a partir da quantidade total de folículos íntegros de cada grupo estudado (controle não cultivado do dia 0, MEM, Q10, Q25 e Q50) e em cada tempo de cultivo (Dia 5 e 10). Diferenças entre as taxas foliculares de cada grupo e em cada dia foram analisadas pelo teste de Qui-quadrado. Na ocorrência de um efeito significativo, as proporções foram comparadas por um teste de proporção 2x2 para se estabelecer o Ranking entre os tratamentos. Os dados referentes à análise de EROs foram analisados previamente quanto à normalidade de distribuição dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene. Na sequência os dados foram analisados por ANOVA e na presença de um efeito significativo, como teste de média Post-hoc, foi empregado o teste de Tukey. Os dados foram apresentados como porcentagem (%), média (M) e erro padrão da média (EP). Toda a análise estatística foi realizada no programa estatístico Minitab® 18.1.1.

RESULTADOS

No presente estudo foi analisado um total de 1.141 folículos pré-antrais ovarianos. O grupo não cultivado foi um controle interno do experimento para aferir as condições iniciais do tecido ovariano obtido e apresentou 52,9% (92/174) de folículos íntegros, 47,1% (82/174) de degenerados (92/174), 52,2% (24/46) primordiais e 53,1% (68/128) em desenvolvimento. Entre os tratamentos (MEM, Q10, Q25 e Q50,) para 5 ou 10 dias de cultivo, cerca de 26% (295/1.141) dos folículos eram primordiais (Figura 2a) e 74% (846/1141) eram folículos em desenvolvimento (Figura 2b e c). A avaliação morfológica revelou que 52,23% (596/1141) dos folículos foram considerados íntegros.

Em relação à avaliação histológica para o total de folículos íntegros, a suplementação com 25 µg/mL de quercetina apresentou 67,3% (105/156) de folículos íntegros, sendo uma proporção superior ($p = 0,03$) aos outros tratamentos (controle MEM e diferentes concentrações de quercetina; Figura 3) no cultivo *in vitro* por 5 dias. Durante o cultivo *in vitro* por 10 dias, a suplementação com 25 µg/mL de quercetina também resultou em uma significativa proporção de folículos íntegros (57,1%; 76/133; $p = 0,01$) em relação aos outros tratamentos (Figura 4).

Para avaliação histológica dos folículos primordiais, a suplementação com diferentes concentrações de quercetina (por 5 e 10 dias) resultou em proporções de folículos íntegros semelhantes ($p = 0,157$; $p = 0,16$) independentemente se o sistema de cultivo foi por 5 ou 10 dias (Tabela 1). Porém, ao avaliar a porcentagem de folículos em desenvolvimento, o tratamento Q25 aos 5 dias de cultivo *in vitro* foi o melhor ($p = 0,05$) em manter a integridade morfológica dos folículos na análise histológica (68,7%), junto ao tratamento Q50 (57,5%) nesse mesmo período (Tabela 1). Já no cultivo *in vitro* por 10 dias, o tratamento Q25 (62,8%) apresentou a maior proporção de folículos em desenvolvimento.

Ensaio antioxidante do poder de redução do ferro (FRAP)

A análise do FRAP referente ao cultivo por 5 dias não resultou em diferença entre o controle cultivado e os tratamentos com adição de quercetina ($p > 0,05$; Figura 5). Entretanto, o ensaio do FRAP indicou que a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ de quercetina aos 10 dias no cultivo *in vitro* apresentou considerável potencial antioxidante ($p = 0,03$), demonstrando a maior capacidade de redução do ferro entre os tratamentos avaliados (Figura 6).

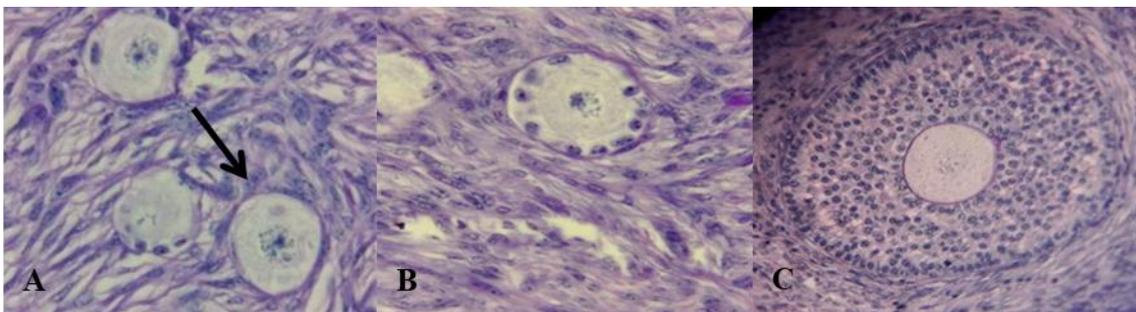


Figura 2 - Classificação morfológica utilizada para os folículos pré-antrais. (a) folículo primordial íntegro (seta), (b) folículo primário íntegro e (c) folículo secundário íntegro. As seções foram coradas pelo Schiff com ácido periódico (PAS) e hematoxilina. 40 x ampliação.

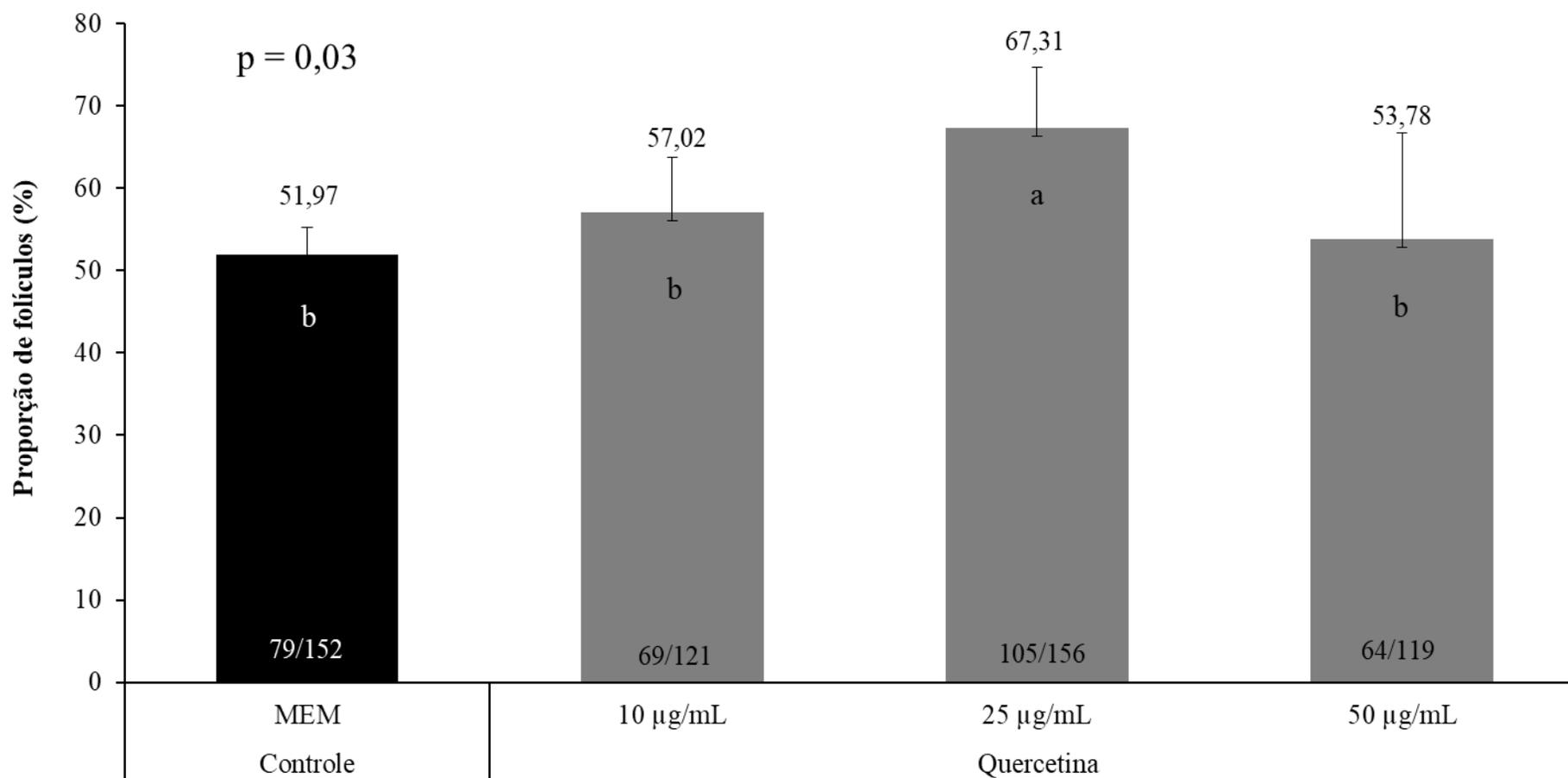


Figure 3 - Porcentagem total de folículos íntegros avaliados durante 5 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos bovinos, tratados com meio essencial mínimo (MEM) adicionado com diferentes concentrações de Quercetina (10, 25 e 50 µg/mL).

Letra minúscula diferentes entre colunas (a-b), significa diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

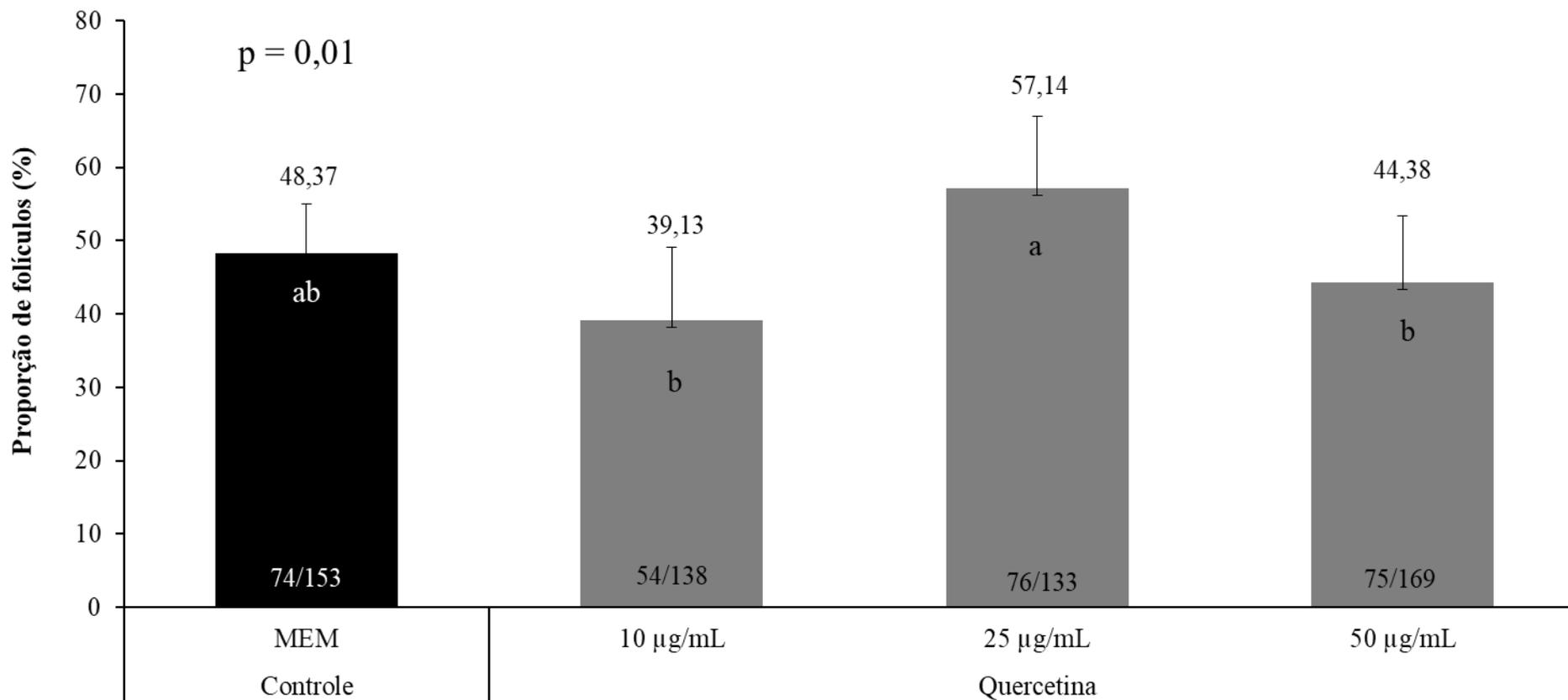


Figura 4 - Porcentagem total de folículos íntegros avaliados durante 10 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos bovinos, tratados com meio essencial mínimo (MEM) adicionado com diferentes concentrações de Quercetina (10, 25 e 50 µg/mL).

Letra minúscula diferentes entre colunas (a-b), significa diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

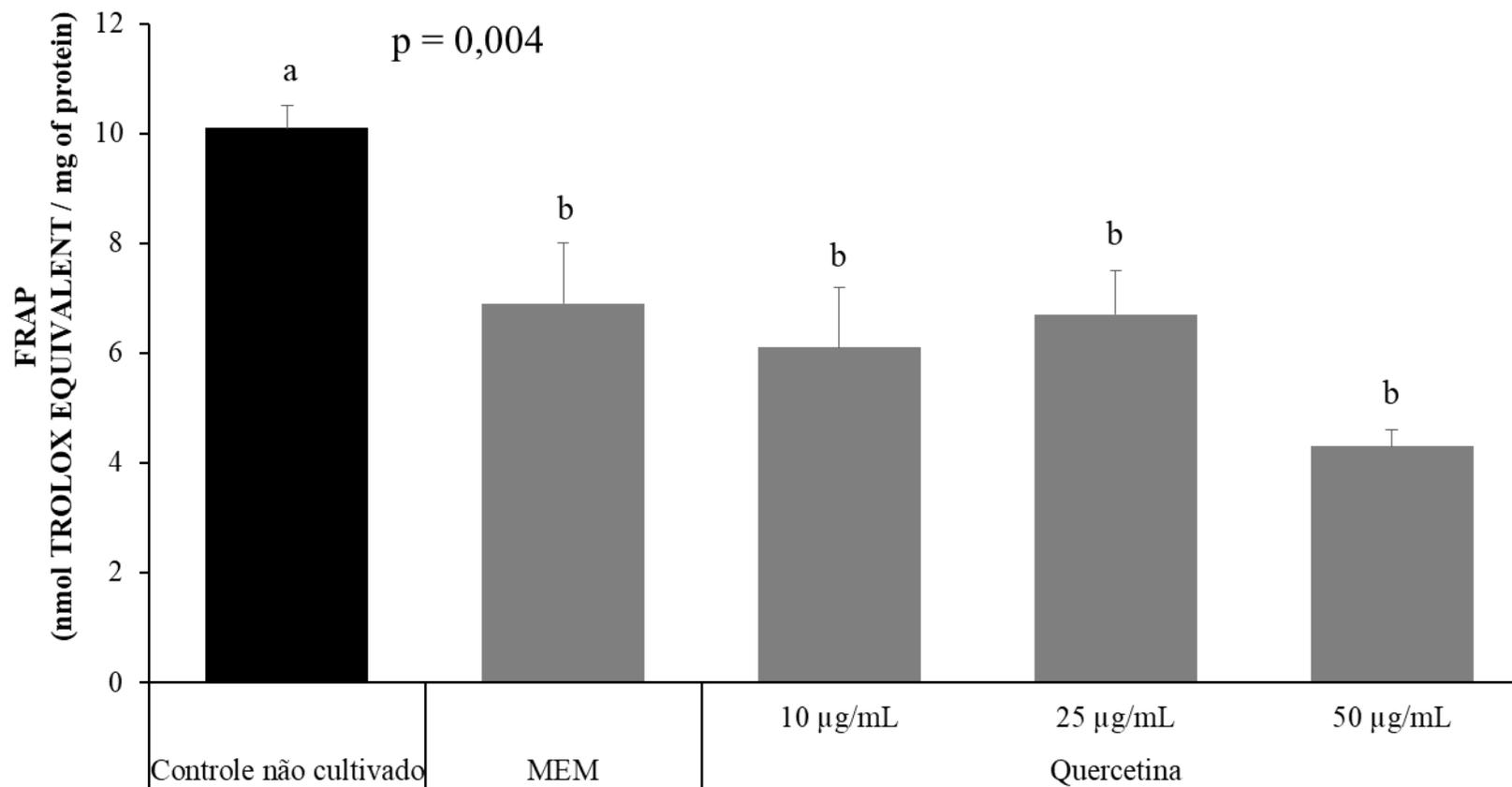


Figura 5 - Níveis de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) analisados nos dias 0 (controle não cultivado) e 5 de cultivo *in vitro* em meio essencial mínimo (MEM) com adição da quercetina em 0, 10, 25 e 50 µg/mL. Os dados estão apresentados na forma de mediana e erro padrão (\pm).

Letras minúsculas diferentes entre colunas (a-b) significa diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

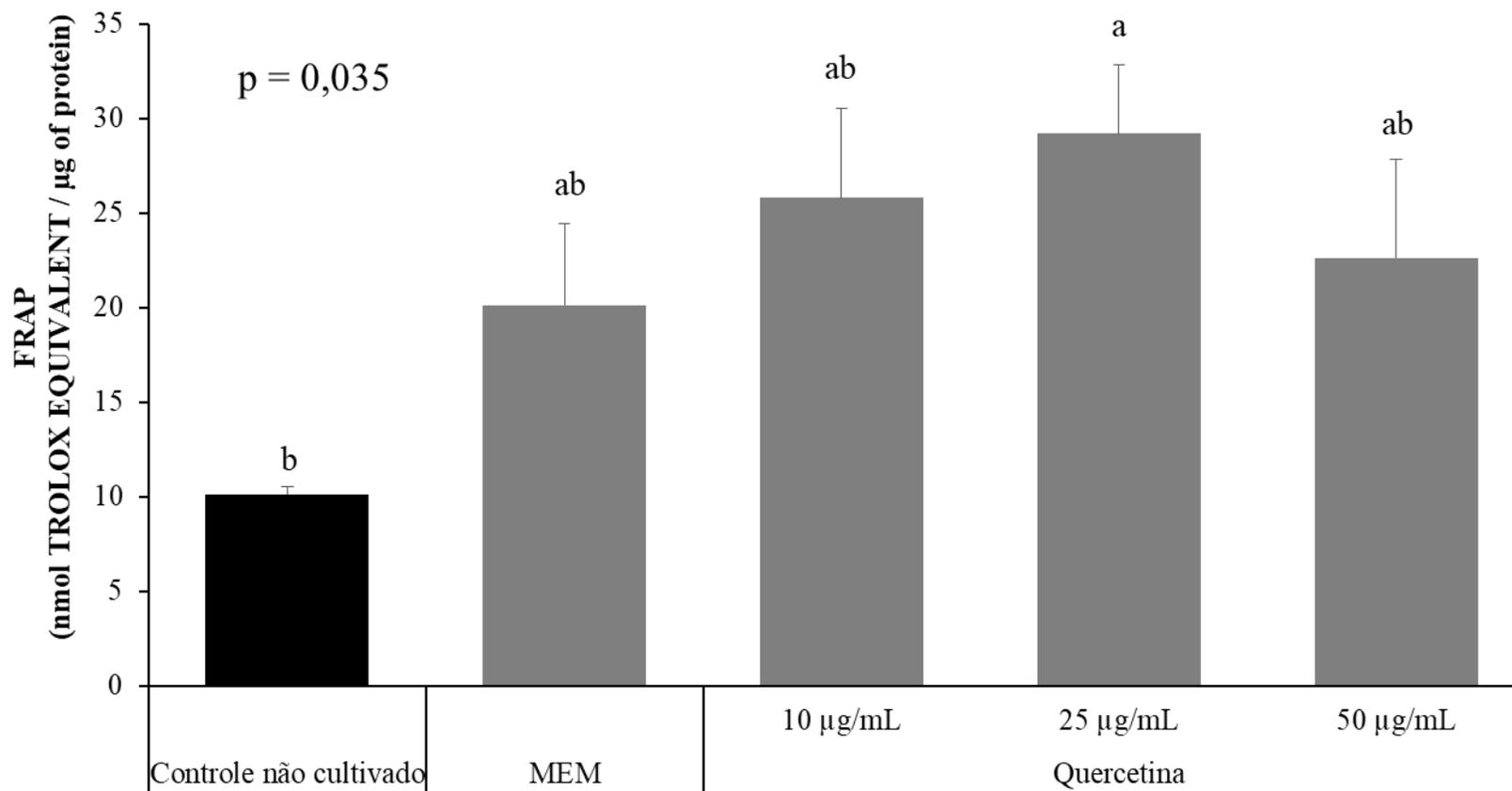


Figura 6 - Níveis de poder antioxidante redutor férrico (FRAP) analisados nos dias 0 (controle não cultivado) 10 de cultivo *in vitro* em meio essencial mínimo (MEM) com adição da quercetina em 0, 10, 25 e 50 µg/mL. Os dados estão apresentados na forma de mediana e erro padrão (\pm) Letras minúsculas diferentes entre colunas (a-b) significa diferença estatística ($p < 0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 1 – Porcentagem total de folículos primordiais ou em desenvolvimento (primários e secundários) avaliados durante 5 ou 10 dias de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos bovinos, tratados com meio essencial mínimo suplementado (MEM*) ou adicionado com diferentes concentrações de Quercetina (10, 25, e 50 µg/mL).

Tratamento	Cultivo de 5 dias			Cultivo de 10 dias		
	Primordial % (n/N)	Desenvolvimento % (n/N)	Total íntegros N	Primordial% (n/N)	Desenvolvimento% (n/N)	Total íntegros N
MEM	47,7% (21/44)	53,7% ^b (58/108)	79	47,0% (16/34)	48,7% ^b (58/119)	74
Q 10	56,5% (13/23)	57,1% ^b (56/98)	69	25,9% (14/54)	47,6% ^b (40/84)	54
Q 25	50,0% (6/12)	68,7% ^a (99/144)	105	43,6% (17/39)	62,8% ^a (59/94)	76
Q 50	45,1% (18/39)	57,5% ^{ab} (46/80)	64	36,0% (18/50)	47,9% ^b (57/119)	75
Valor de p / Total	0,87	0,05	317	0,16	0,008	279

Valores seguidos de letras minúsculas sobrescritas (a, b) e dentro de uma mesma coluna diferem estatisticamente ($p < 0.05$) entre os tratamentos.

DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que avaliou os efeitos da adição de quercetina sobre o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em tecido ovariano de novilhas na espécie bovina. Adicionalmente, investigamos o potencial antioxidante de diferentes concentrações de quercetina nos fragmentos ovarianos cultivados, sendo que os resultados obtidos pelo método FRAP foram condizentes aos principais achados do estudo histológico. Portanto, o presente estudo apresenta uma importante contribuição para melhoria no sistema de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos em fragmentos ovarianos de bovinos

O presente estudo relata efeito significativo na preservação da integridade folicular e na proporção de folículos em desenvolvimento ao ser empregado a quercetina como antioxidante suplementado ao meio essencial mínimo no sistema de cultivo *in vitro* de fragmentos ovarianos bovinos. A concentração de 25 µg/mL por 5 (67, 3%) e 10 dias (57,14%) de cultivo diferiu ao apresentar proporções superiores aos outros tratamentos em relação à integridade morfológica. Além disso, a concentração de concentração 25 µg/mL resultaram numa proporção significativamente superior de folículos em desenvolvimento durante o cultivo de 5 e 10 dias. A metodologia de fragmentação do ovário utilizada no presente estudo pode ter tido influência no resultado da proporção de folículos totais em desenvolvimento (26%) descritos. Hsueh e Kawamura (2020) relatam que a fragmentação ovariana utilizada no tratamento da insuficiência ovariana prematura leva a interrupção da sinalização da via Hippo e promove a polimerização da actina, o que resulta no desenvolvimento folicular e possivelmente desencadeia ativação folicular. Dessa forma, a fragmentação ovariana aplicada na metodologia do presente estudo pode ter desencadeado um aumento na porcentagem de folículos em desenvolvimento.

Ao observarmos o resultado da análise de FRAP, as amostras não demonstraram diferenças em relação ao potencial antioxidante total durante o cultivo por 5 dias. Entretanto, a mesma concentração que foi relevante para integridade morfológica na histologia (Q25 D5 e Q25 D10), resultou em diferença ($p=0,035$) durante o cultivo *in vitro* por 10 dias ao aumentar o potencial antioxidante do tecido. Esse resultado pode ser devido, em parte, à quercetina reverter o estresse relacionado às maiores concentrações de oxigênio no ambiente *in vitro* após 10 dias de cultivo. Tal resultado é interessante porque o ambiente *in vitro* frequentemente proporciona aos gametas maiores condições

de estresse oxidativo e, conseqüentemente uma maior formação de EROs (AGARWAL et al., 2012).

As EROs estão normalmente envolvidas em eventos reprodutivos, como desenvolvimento folicular, ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo, luteólise e desenvolvimento embrionário inicial (RIZZO et al., 2012, WANG et al., 2017). No entanto, um desequilíbrio entre os radicais livres e antioxidantes pode causar tanto falhas na concepção, como na ruptura do folículo pré-ovulatório, resultando na formação de cisto folicular em bovinos (RIZZO et al., 2009; TALUKDER et al., 2014). Dessa forma, apesar das EROs estarem relacionadas a diferentes momentos do ciclo reprodutivo, o excesso pode levar a danos nas estruturas celulares, prejudicando a qualidade dos oócitos (TAMURA et al., 2008). Além disso, o excesso de EROs pode afetar o funcionamento mitocondrial e levar a apoptose celular em zigotos (LIU et al., 2000) e em oócitos submetidos à maturação folicular *in vitro* (TATEMOTO et al., 2000).

Nesse contexto, a adição de antioxidantes ao meio de cultivo é uma alternativa para tentar minimizar os danos causados pelo excesso de espécies reativas de oxigênio *in vitro*, e o antioxidante quercetina é uma opção. O estudo de Sirotkin et al. (2019) relata que a quercetina pode modular a proliferação celular e apoptose em células ovarianas, como também a liberação de hormônios esteroides e peptídicos no cultivo *in vitro* de células ovarianas, além de apresentar uma atividade que parece ser espécie específica. No presente estudo, a quercetina demonstrou relevância em promover ação antioxidante no tecido ovariano. Esse resultado corrobora com o estudo de Wang et al., (2018), que relata que a adição de quercetina foi eficiente em regular e aumentar a capacidade antioxidante de ovários de camundongos na menopausa tanto *in vivo* como *in vitro*.

Os benefícios relatados da quercetina para outros órgãos e sistemas estão mais bem estabelecidos. Além disso, já é conhecido que há uma concentração específica e apropriada para o metabolismo celular, uma vez que quantidades excessivas de quercetina podem ser deletérias para os oócitos. Por exemplo, Kang et al. (2016) descreveram que a alta concentração (100 µg/mL) de quercetina result em menores taxas de maturação de oócitos em suínos, sendo considerada como tóxica. Estes resultados corroboram com nossos resultados, uma vez que a concentração de 50 µg/mL (maior concentração do presente estudo) não foi eficiente em manter a integridade folicular.

CONCLUSÃO

A proposta do presente estudo foi pautada em identificar a melhor concentração de quercetina para o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos ao ressaltar a importância de um ambiente *in vitro* equilibrado em relação as EROs. Dessa forma, ao menos com base nos nossos resultados, a concentração de 25 µg/mL foi eficiente em manter a integridade e desenvolvimento no cultivo *in vitro* por 5 dias, e foi capaz de aumentar o potencial antioxidante no cultivo durante 10 dias.

REFERÊNCIAS

ABIR, R. et al. In vitro maturation of human primordial ovarian follicles: Clinical significance, progress in mammals, and methods for growth evaluation. **Histology and Histopathology**, v. 21, n. 7–9, p. 887–898, 2006.

BATIHA, G.E., BESHBIHY, A.M., IKRAM, M., et al. The Pharmacological Activity, Biochemical Properties, and Pharmacokinetics of the Major Natural Polyphenolic Flavonoid: Quercetin. **Foods**, v.9, ed.3, p. 374, 2020.

BENZIE, I.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v.239, p.70-76, 1996.

BIZARRO-SILVA, C.; SANTOS, M.M.; GEREZ, J.R.; GONZÁLEZ, S.M.; LISBOA, L.A.; SENEDA, M.M. Influence of follicle-stimulating hormone concentrations on the integrity and development of bovine follicles cultured. **Zygote**. v.26, p.1 - 7, 2018.

CARÁMBULA, S.F.; GONÇALVES, P.B.D.; COSTA, L.F.S.; FIGUEIREDO, J.R.; WHEELER, M.B.; NEVES, J.P.; MONDADORI, R.G. Effect of fetal age and method of recovery on isolation of preantral follicles from bovine ovaries. **Theriogenology**, 52 (1999), pp. 563-571.

FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R.; AMORIM, C.A.; SILVA, J.R.V. Manipulação de oócitos inclusos em folículos ovarianos pré-antrais. In: Gonçalves PBD, Figueiredo JR, Freitas VJF. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. 2. ed. São Paulo: Roca. v.16, p. 303–327, 2008.

GALATI, G.; GALATI, G; SABZEVARI, O.; WILSON, J.X.; O'BRIEN, P.J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, p.91-104, 2002.

GOMES, R.G.; LISBOA, L.A.; SILVA, C.B.; MAX, M.C.; MARINO, P.C.; OLIVEIRA, R.L.; GONZÁLEZ, S.M.; BARREIROS, T.R.R.; MARINHO, L.S.R.; SENEDA, M.M. Improvement of development of equine preantral follicles after 6 days of in vitro culture with ascorbic acid supplementation. **Theriogenology**, v.84, p.750 - 755, 2015.

GOMES, R.G.; SILVA, C.B.; GONZÁLEZ, S.M.; OLIVEIRA, R.L.; MAX, M.C.; LISBOA, L.A.; BARREIROS, T.R.R.; SANTOS, M.M.; SARAPIÃO, F.D.; GASTAL, E.L.; SENEDA, M.M. Alpha lipoic acid (ALA) effects on developmental competence of equine preantral follicles in short-term culture. **Theriogenology**. v.105, p.169 - 173, 2018.

GUPTA, S.; SEKHON, L.; AGARWAL, A. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Assisted Reproduction. **Current Women's Health Reviews**, v.6 p.227–238, 2010.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.JR. Free radical scavenging and antioxidant

activity of plants flavonoids. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 366, p. 351-376, 1994.

KANG, J.T.; MOON, J.H.; CHOI, J.Y.; PARK, S.J.; KIM, S. J.; SAADELDIN, I.M.; LEE, B.C. Effect of Antioxidant Flavonoids (Quercetin and Taxifolin) on In vitro Maturation of Porcine Oocytes. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, p. 352-358, 2016.

JAN, M.H.; DAS, G.K.; KHAN, F.A.; SINGH, J.; BASHIR, S.T.; KHAN, S.; PRASAD, J.K.; MEHROTRA, S.; PATHAK, M.C.; SINGH, G., SARKAR, M. Evaluation of follicular oxidant-antioxidant balance and oxidative damage during reproductive acyclicity in water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 3, p.35-40, 2014.

LIU, L.; TRIMARCHI, J.R., KEEFE, D.L. Involvement of mitochondria in oxidative stress-induced cell death in mouse zygotes. **Biology of Reproduction**, v. 62, p.1745-53, 2000.

LOURENCO-GONZALEZ, Y.; FATTORI, V.; DOMICIANO, T.P.; ROSSANEIS, A.C.; BORGHI, S.M.; ZANINELLI, T.H.; BERNARDY, C.C.F.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, T.M.; CUNHA, F.Q.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W.A. JR. Repurposing of the Nootropic Drug Vinpocetine as an Analgesic and Anti-Inflammatory Agent: Evidence in a Mouse Model of Superoxide Anion-Triggered Inflammation. **Mediators of Inflammation**, v.31, p. 6481812, 2019

LOWMAN, B. G.; SCOTT, N. A.; SOMERVILLE, S. H. Condition scoring of cattle. Edinburgh: Edinburgh School of Agriculture, 1976.

LUVONI, G.C.; KESKINTEPE, L.; BRACKETT, B.G. Improvement in bovine embryo production in vitro by glutathione-containing culture media. **Molecular Reproduction and Development**, v.43, p.437-443, 1996.

MARIANI, C.; BRACA, A., VITALINI, S.; TOMMASI, N.D.E.; VISIOLI, F.; FICO, G. Flavonoid characterization and in vitro antioxidant activity of *Aconitum anthora* L. (Ranunculaceae). **Phytochemistry**, v.69, p. 6. 2008.

MAX, MC; SILVA, CB; GONZÁLEZ, SM; LINDQUIST, AG; BÚFALO, I; GOMES, RG; MOROTTI, F; COSTA, CB; BARREIROS, TRR; LISBOA, LA; SENEDA, MM. The development and integrity of equine pre-antral follicles cultured in vitro with follicle-stimulating hormone (FSH) supplementation. **Reproduction in Domestic Animals**, v.52, p.899 - 904, 2017.

MAX, M.C.; BIZARRO-SILVA, C.; BÚFALO, I.; GONZÁLEZ, S.M.; LINDQUIST, A.G.; GOMES, R.G.; BARREIROS, T.R.R.; LISBOA, L.A.; MOROTTI, F.; SENEDA, M.M. In vitro culture supplementation of EGF for improving the survival of equine preantral follicles. **In vitro cellular developmental biology. Animal**. v.54, p. 687-691., 2018.

RIZZO, A.; MINOIA, G.; TRISOLINI, C.; MANCA, R.; SCIORSCI, R.L. Concentrations of free radicals and beta-endorphins in repeat breeder cows. **Animal Reproduction Science**, v.100, p.257-263, 2007.

RIZZO, A.; MINOIA, G.; TRISOLINI, C.; MUTINATI, M.; SPEDICATO, M.; JIRILLO, F.; SCIORSCI, R.L. Reactive oxygen species (ROS): involvement in bovine follicular cysts etiopathogenesis. **Immunopharmacol Immunotoxicol**, v.31, p.631-635, 2009.

RIZZO, A.; ROSCINO, M.T.; BINETTI, F.; SCIORSCI, R.L. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. **Reproduction Domestic Animals**, v. 47, p.344-352, 2012.

ROSSETTO, R. et al. AVANÇOS NO ISOLAMENTO E SISTEMAS DE CULTIVO DE FOLÍCULOS PRÉ-ANTRAIS. **Acta Veterinária Brasilica**, n. 1, p. 15–23, 2011.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE, A.B.G.; LOPES, C.A.P., FIGUEIREDO, J.R. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, n.3, p.315-326, 2011.

SILVA-SANTOS, K.C.; SANTOS, G.M.; SILOTO, L.S.; HERTEL, M. F.; ANDRADE, E. R.; RUBIN, M. I.; STURION, L.; MELO-STERZA, F. A.; SENEDA, M. M.. Estimate of the population of preantral follicles in the ovaries of *Bos taurus indicus* and *Bos taurus taurus* cattle. **Theriogenology**, v.76, ed.6, p.1051-1057, 2011

SILVA, C.B.; BERGAMO, L.Z.; BÚFALO, I.; BONATO, D.V.; SENEDA, M.M. Comparison among different systems of in vitro culture of preantral follicles in cattle. **Proceedings of the 31st Annual Meeting of the Brazilian Embryo Technology Society (SBTE)**; Cabo de Santo Agostinho, PE, Brazil, August 17th to 19th, 2017. Abstracts.

SIROTKIN AV, HRABOVSKÁ S, ŠTOCHMALOVÁ A, GROSSMANN R, ALWASEL S, HALIM HARRATH A. Effect of quercetin on ovarian cells of pigs and cattle. **Animal Reproduction Science**, v.205, p.44-51, 2019.

TALUKDER, S.; INGENHOFF, L.; KERRISK, K.L., CELI, P. Plasma oxidative stress biomarkers and progesterone profiles in a dairy cow diagnosed with an ovarian follicular cyst. **Veterinary Quarterly**, v.34, p.113- 117, 2014.

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; MIWA, I.; TANIGUCHI, K.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; TAKETANI, T.; MATSUOKA, A.; YAMAGATA, Y.; SHIMAMURA, K.; MORIOKA, H.; ISHIKAWA, H.; REITER, R.J.; SUGINO, N. Oxidative stress impairs oocyte quality and melatonin protects oocytes from free radical damage and improves fertilization rate. **Journal of pineal research**, v.44, p.280-287, 2008.

TATEMOTO, H, SAKURAI, N, MUTO, N. Protection of porcine oocytes against apoptotic cell death caused by oxidative stress during In vitro maturation: role of cumulus cells. **Biology of Reproduction**, v.63, p.805-10, 2000.

WANG, J.; QIAN, X.; GAO, Q.; LV, C.; XU, J.; JIN, H.; ZHU, H. Quercetin increases

the antioxidant capacity of the ovary in menopausal rats and in ovarian granulosa cell culture in vitro. **Journal of Ovarian Research**, v.11, ed.1, p. 51, 2018.

WANG, S.; HE, G.; CHEN, M.; ZUO, T.; XU, W.; LIU, X. The Role of Antioxidant Enzymes in the Ovaries. **Oxidative Medicine Cellular Longevity**, 4371714, 2017.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A quercetina é um antioxidante que permitiu a manutenção da viabilidade folicular e resultou numa proporção significativa de folículos em desenvolvimento na concentração de 25µg/ mL durante o cultivo *in vitro* por 5 e 10 dias.
- O potencial antioxidante total da quercetina demonstrou a melhor capacidade em reduzir o ferro na dose de 25 µg/mL durante o cultivo *in vitro* por 10 dias.
- A quercetina se mostrou um antioxidante em potencial para ser adicionado ao meio de cultivo para fragmentos ovarianos de bovinos.