

CAMILA MARINHO DE MIRANDA OLIVEIRA MEIRELES

AÇÃO DA MIRICETINA NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS

RECIFE

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

CAMILA MARINHO DE MIRANDA OLIVEIRA MEIRELES

AÇÃO DA MIRICETINA NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação submetida à
Coordenação do curso de Pós-
Graduação em Ciência
Veterinária, como parte dos
requisitos para a obtenção do título
de Mestre em Ciência Veterinária.
Orientadora: Prof^a Dr^a Aurea
Wischrall
Co-orientador: Prof. Dr. André
Mariano Batista.

**RECIFE
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

M514a Meireles, Camila Marinho de Miranda Oliveira.

Ação da Miricetina na maturação in vitro de oócitos bovinos / Camila Marinho

De Miranda Oliveira Meireles. – Recife, 2018.

50 f.: il.

Orientador(a): Aurea Wischral.

Coorientador(a): André Mariano Batista.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária, Recife, BR-PE, 2018.

Inclui referências.

1. Antioxidante 2. Blastocisto 3. Terminal deoxinucleotil transferase Uracil Nick

End Labeling I. Wischral, Aurea, orient. II. Batista, André Mariano, coorient. III. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

AÇÃO DA MIRICETINA NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS

Dissertação de mestrado elaborada por

Camila Marinho de Miranda Oliveira Meireles

Aprovada em 03/08/2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Aurea Wischral
Orientadora - Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

Prof. Dr. Cláudio Coutinho Bartolomeu
Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

Prof. Dr. André Mariano Batista
Departamento de Medicina Veterinária-UFRPE

Dr. Antônio Santana dos Santos Filho
Instituto Agrônomo de Pernambuco – IPA

DEDICATÓRIA

*Por todos os dias de minhas ausências, ao
meu amado esposo, essa conquista é nossa!*

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer é tentar outra vez”

Thomas Edson

AGRADECIMENTOS

Começo meus singelos agradecimentos, louvando a Deus! Sem Ele nada é possível!

À toda minha família, pelo apoio incondicional de todas as horas, sempre estimulando meu melhoramento intelectual. Especialmente ao meu amado esposo, Joaquim, que batalhou comigo todos os caminhos difíceis de nossa história. E aos meus pais, Isac e Marta, meus ídolos, meus espelhos de pessoas de bem!

À professora Aurea e André Mariano pela paciência, disponibilidade e conhecimentos compartilhados.

Aos queridíssimos, Miguel, Gil, Irlene, Manoela, Guilherme e Mateus, que abriram as portas da sua casa e acolheram-me, fazendo-me sentir como integrante desta família, sou extremamente grata a vocês.

À minha querida Joana Amélia, meu braço direito na empreitada do mundo científico.

Aos amigos da Reprodução/UFRPE, pela troca de experiências, pela companhia, pelos risos que tornam as dificuldades mais leves naqueles momentos em que se acha que tudo foi por água abaixo.

À UFRPE pela oportunidade de alcançar um sonho!

A todos que contribuíram para que esse dia chegasse, meu MUITISSÍMO OBRIGADA!

APOIO FINANCEIRO

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

	Página
Figura 1- Estrutura básica dos flavonóides.....	24
Figura 2- Estrutura química da miricetina.....	25
Artigo - AÇÃO DA MIRICETINA NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS	
Tabela 1 - Efeito da miricetina sobre a maturação de oócitos bovinos.....	42
Tabela 2 - Uso da miricetina na maturação in vitro e seu efeito para a competência do desenvolvimento embrionário.....	43
Tabela 3 - Número total de blastômeros, número de blastômeros apoptóticos e taxa de apoptose em embriões bovinos avaliados através da técnica de TUNEL.....	43

LISTA DE ABREVIATÓES

CAT- Catalase

CIV – Cultivo *in vitro*

COC's – Complexos cumulus-oócitos

EROs- Espécies Reativas ao Oxigênio

Gpx - Glutathione peroxidase

GSH – Glutathione

GR – Glutathione Redutase

GV – Vesícula germinativa

GVBD – Ruptura da vesícula germinativa

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

ITS – Insulina-transferrina-selênio

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

MIV – Maturação *in vitro*

PBS – Tampão fosfato salino

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

PVP - Polivinilpirrolidona

O₂ – Oxigênio

O²⁻ – Superóxido

SFB – Soro Fetal Bovino

SOD – Superóxido dismutase

SOF – *Sintetic Ovarium Fluid*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES (PIVE).....	15
3.2 MATURAÇÃO <i>IN VITRO</i>	16
3.3 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV).....	17
3.4 CULTIVO <i>IN VITRO</i> (CIV).....	17
3.5 ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (EROs).....	18
3.6 RADICAL SUPERÓXIDO (O_2^-)	20
3.7 RADICAL HIDROXILA (OH^-).....	20
3.8 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2).....	20
3.9 ANTIOXIDANTES.....	21
3.10 ANTIOXIDANTES USADOS NA PIVE BOVINA	22
3.10.1 CISTIAMINA	22
3.10.2 INSULINA-TRANSFERRINA-SELÊNIO	23
3.10.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FUNÇÕES DOS FLAVONÓIDES (MIRICETINA).....	23
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26
5. ARTIGO.....	37

RESUMO

Nos sistemas *in vitro* de produção de embriões (PIVE), a maturação oocitária (MIV) é um dos passos limitantes, inclusive devido à agressão de EROs produzidas no sistema. A miricetina é um dos flavonoides naturais, conhecida por seu potencial antioxidante, que pode proporcionar avanços na PIVE, sendo suplementada no meio de MIV. Com o objetivo de testar os efeitos da miricetina sobre a MIV de bovinos, oócitos foram maturados por 24 h na presença (1, 5 e 10 μM) ou na ausência (grupo controle) de miricetina. Os oócitos foram corados com *Hoechst* e visualizados em microscópio de fluorescência para avaliação nuclear. A percentagem de maturação nuclear não diferiu entre os grupos controle (64,5%), e tratamentos 1 μM (66,9%) e 5 μM (70,8%), porém o tratamento com 10 μM (42,7%) mostrou-se desfavorável para os oócitos. Quanto à avaliação do desenvolvimento embrionário, os oócitos foram fertilizados e cultivados *in vitro*, sendo as taxas de desenvolvimento embrionário determinadas no sétimo dia de cultivo. Na fase de produção de embriões foi-se testado apenas o tratamento controle e o 1 μM de miricetina, onde não houve variação significativa ($P < 0,05$) nas as taxas de desenvolvimento embrionário, entre o grupo controle (47,2%) e o tratamento 1 μM (33,3%). Os embriões produzidos foram corados pela técnica do TUNEL, a fim de avaliar sinais de apoptose celular, revelando que, o grupo tratamento 1 μM apresenta menor taxa de blastômeros apoptóticos (27%), quando comparados ao grupo controle (41,2%) ($P < 0,05$). Conclui-se que a suplementação da maturação *in vitro* com antioxidante miricetina em dose de 10 μM de miricetina interfere na taxa de maturação oocitária, já quanto a produção embrionária, o uso de 1 μM de miricetina não interfere a taxa de produção de blastocistos e diminui o número de blastômeros apoptóticos.

Palavras-chave: antioxidante, blastocisto e *Terminal Deoxinucleotil*

Transferase Uracil Nick End Labeling.

ABSTRACT

In the in vitro embryo production systems (PIVE), culture maturation (IVM) is one of the limiting steps, specially due to the action of EROs produced in the system. Myricetin is one of the natural flavonoids, known for its antioxidant potential, which may improve the PIVE, being supplemented in the medium of IVM. In order to test the effects of myricetin on bovine IVM, oocytes were matured for 24 h in the presence (1, 5 and 10 μM) or in the absence (control group) of myricetin. The oocytes were stained with Hoechst and visualized under a fluorescence microscope for nuclear evaluation. The percentage of nuclear maturation did not differ between the control group (64.5%), and treatments 1 μM (66.9%) and 5 μM (70.8%), but treatment with 10 μM (42.7%) was damaging for oocytes. Regarding the evaluation of the embryonic development, the oocytes were fertilized and cultured in vitro, being the embryonic development rates determined after 7 days of culture. In the embryo production phase, only myricetin 1 μM was used. Relative to embryonic development rates, there was not difference ($P > 0.05$) between control group (47.2%) and treatment 1 μM (33.3%). The embryos were stained by the TUNEL technique, in order to evaluate cell apoptosis signs, revealing that the myricetin 1 μM treatment resulted in a lower rate of apoptotic blastomers (27%) when compared to the control group (41.2%) ($P < 0.05$). It was concluded that the IVM supplementation with 10 μM myricetin interferes in oocyte maturation rate, however, 1 μM myricetin does not interfere in the rate of blastocyst production and decreases the number of apoptotic blastomers.

Keywords: antioxidant, blastocyst and *Terminal Deoxynucleotil Transferase Uracil Nick End Labeling*.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura no agronegócio brasileiro vem crescendo constantemente, assumindo um importante papel no cenário mundial na produção de leite e de carne (BATISTELLA et al., 2012). Durante o último censo em 2016, o rebanho nacional era estimado em 218,23 milhões de cabeças de bovinos (IBGE, 2016). Com esse grande potencial produtivo, diversos são os desafios para a melhoria e manutenção da qualidade genética dos animais, demandando esforços técnico-científicos multidisciplinares (ANDRADE et al., 2015). Assim, a reprodução animal constitui-se num dos fatores de maior importância que afeta diretamente a eficiência e a rentabilidade dos sistemas produtivos (NEVES et al., 2010).

A instituição de práticas adequadas nos manejos nutricionais, sanitários e reprodutivos garantem a otimização da produção, principalmente, quando associadas à utilização de biotécnicas reprodutivas em concordância com programas de melhoramento genético, que auxiliam na obtenção de animais com melhores padrões zootécnicos (CARNEIRO et al., 2007). Uma das biotécnicas usadas para a multiplicação eficiente dos rebanhos é a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (MÁXIMO, 2009). Esta técnica é dividida nas etapas de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), que possuem a capacidade de otimizar a obtenção de embriões e, conseqüentemente, nascimentos de produtos viáveis. A técnica de MIV tem como objetivo mimetizar as condições observadas *in vivo* no ovário durante a fase de desenvolvimento folicular (GONÇALVES et al., 2002).

Um dos fatores para se lograr êxito na PIVE é a realização de uma boa recuperação de oócitos, selecionando os que apresentam os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) em boa qualidade e quantidade, já que oócitos de alta qualidade podem melhorar a maturação oocitária e a competência de desenvolvimento embrionário no sistema de produção *in vitro* (LIN et al., 2016). Logo, a obtenção de melhores taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário está interligada diretamente a obtenção de boas taxas de MIV, uma vez que tanto a maturação citoplasmática quanto a nuclear garantem ao oócito

a capacidade de poder ser fecundado e evoluir até o estágio embrionário (PADILHA, 2012).

A MIV é fator limitante para todo o processo da PIVE, já que a maturação *in vivo* depende de fatores de crescimento e hormônios que atuam nos processos de ativação, crescimento, diferenciação, maturação e atresia folicular (PADILHA, 2012). Durante o cultivo *in vitro* de oócitos os níveis de antioxidantes são mais baixos do que *in vivo*, uma vez que não há proteção dos antioxidantes maternos. Assim a suplementação do meio de cultivo com esses compostos, pode vir a ser importante para a maturação *in vitro* (ZHENGGUANG et al., 2007).

Portanto, a adição de antioxidantes como a miricetina, a fim de suplementar o meio de cultura na maturação de oócitos bovinos, poderá melhorar os resultados e reforçar os estudos da relação de flavonóides com as biotécnicas reprodutivas.

Os flavonóides pertencem a uma classe de compostos polifenólicos produzidos por plantas, a partir da via dos fenilpropanóides, que possuem grande capacidade antioxidante em várias reações metabólicas no organismo (DORNAS et al., 2007). A formação de espécies reativas ao oxigênio (EROS), como ânions de superóxido, radicais hidroxilas e peróxido de hidrogênio, é comum em processos celulares onde há derivação do oxigênio, durante a transferência de elétrons. Existem evidências que as ROS sejam benéficas em algumas etapas da reprodução animal, permitindo melhor interação entre os gametas, porém, os estudos *in vitro* demonstram seus efeitos deletérios na reprodução assistida (ZHENGGUANG et al., 2007).

O uso de miricetina pode proporcionar avanços para a PIVE, utilizando-a como suplemento do meio de maturação oocitária, visto que o mesmo nunca foi testado em oócitos bovinos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a utilização da miricetina na produção *in vitro* de embriões bovinos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar o efeito de diferentes concentrações de miricetina na maturação *in vitro* de oócitos bovinos;

- Avaliar a fertilização *in vitro* de oócitos bovinos maturados com meio adicionado de miricetina;

- Avaliar o efeito protetor da miricetina na apoptose de células de embriões bovinos.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES (PIVE)

A PIVE vem sendo gradativamente incorporada nos programas de melhoramento animal como técnica de multiplicação, sendo que seu uso tem aumentado significativamente no Brasil (NEVES et al., 2010). É evidente o impacto dessa técnica na produção animal, que tem se destacado como o método de eleição para a reprodução de animais de interesse econômico no país (VIANA & CAMARGO, 2007).

Ao atingir a puberdade, fêmeas bovinas possuem em média 70.000 oócitos em seus ovários (HAFEZ & HAFEZ, 2004). O oócitos permanecem quiescentes no estágio de prófase I, durante o período de formação e crescimento oocitário e folicular, quando se inicia a puberdade a dominância folicular é instituída e a meiose é retomada. Uma vez iniciada a vida reprodutiva, estabelece-se o recrutamento oocitário no qual os oócitos passam a crescer e maturar. Em todo esse processo *in vivo*, apenas um oócito é ovulado, os demais entram em atresia (HARDY et al., 2000). Assim, a biotécnica da PIVE tem o potencial de resgatar os oócitos imaturos situados nos ovários e cultivá-los *in vitro* até a fase de blastocisto para posterior transferência a fêmeas receptoras (CHAVES et. al, 2010).

3.2 MATURAÇÃO *IN VITRO*

A maturação é uma das fases da PIVE que torna o oócito capaz de ser fecundado e garante um desenvolvimento embrionário inicial normal (PENITENTE FILHO, 2011). Quando imaturos, os oócitos permanecem na fase de prófase I da meiose, também conhecida como vesícula germinativa. Durante a MIV, os oócitos passam por uma série de complexas modificações tanto em seu citoplasma como em seu núcleo, devido a influência dos hormônios gonadotróficos (FISSORE et al., 2002).

A maturação nuclear é marcada pelo reinício da meiose. Devido a influência hormonal, as células saem da fase de prófase I e passam pelas fases de metáfase I, anáfase I, telófase I, na qual a primeira divisão meiótica vem a termo e se inicia a segunda divisão meiótica (MAO et al., 2014). Com a primeira divisão, ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar e o oócito chega a fase de metáfase II (MII) (EDWARDS et al., 2005). Modificações bioquímicas, moleculares e estruturais no citoplasma oocitário fazem-se necessárias para seu desenvolvimento até a fase de blastocisto (CHAVES et al., 2010). Tais modificações citoplasmáticas são processos complexos, nas quais vários eventos simultâneos ocorrem, havendo mudanças na morfologia e na redistribuição de organelas (HAFEZ & HAFEZ, 2004).

A retomada da meiose *in vivo* tem início após o pico pré-ovulatório de LH durante o estro, já *in vitro*, a retirada do oócito do contato com as células foliculares é suficiente para dar início ao processo de maturação nuclear. Em bovinos, o período de maturação varia de 18 a 24 horas em atmosfera controlada contendo 5% de CO₂ em ar e umidade saturada, sendo também necessário cuidados com temperatura, com a suplementação proteica e de fatores de crescimento, sempre em condições ideais ao sistema biológico dos oócitos (GONÇALVES et al., 2007; GARCIA et al., 2004).

Diversos estudos foram realizados com o objetivo de otimizar a MIV, através da suplementação dos meios de maturação com substâncias antioxidantes como quercetina, cistiamina, narigerina dentre outros (MERTON et al., 2013; GUEMRA, 2014; SOLAK et al., 2014). Porém, os resultados obtidos

com MIV ainda são inferiores aos *in vivo*. Assim, uma melhor elucidação dos mecanismos relacionados à MIV é importante para o desenvolvimento e o aperfeiçoamento da biotécnica (SANTOS et al., 2002).

3.3 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* (FIV)

A FIV iniciou-se através de estudos sobre fecundação e desenvolvimento embrionário, com foco na resolução de casos de infertilidade humana, desta forma em 1950 foi obtido o primeiro animal (coelho) pelo uso desta biotécnica (GONSALVES et al., 2002). Em bovinos, a primeira FIV ocorreu no Japão em 1977, porém o primeiro bezerro produzido pela técnica foi gerado nos Estados Unidos da América em 1981 (IRITANI & NIWA, 1977; DODE, 2004). A técnica vem se aprimorando ao longos dos anos e o Brasil tem sido fundamental para sua expansão (MEIRELLES et al., 2008).

Esta fase da PIVE é realizada após as 24h iniciais de maturação oocitária, fazendo-se necessário um ambiente com temperatura a 39 °C, atmosfera controlada com 5% de CO₂ e umidade saturada (PENITENTE FILHO, 2011). Os espermatozoides viáveis, oriundos de palhetas de sêmen congelado, são separados do plasma seminal, crioprotetores, extensores e dos espermatozoides mortos antes de serem co-cultivados juntamente aos oócitos (GONÇALVES et al., 2007).

Na espécie bovina, os métodos de separação espermática mais utilizados são gradiente de *Percoll* e “*swim-up*”. Após a separação, os espermatozoides são diluídos a uma concentração final que pode variar de 1 a 5 x 10⁶ espermatozoides/mL de meio específico para FIV (GONÇALVES et al., 2007). Entretanto, a concentração mais utilizada para fertilização é de 2 x 10⁶ espermatozoides/mL, calculada em conformidade com a motilidade e concentração da fração viva de espermatozoides obtida após a separação em gradiente *Percoll* (YOUNG, 1998). O período de incubação dos oócitos com os espermatozoides varia entre 12 a 20 horas (BUENO & BELTRAN, 2008).

3.4 CULTIVO *IN VITRO* (CIV)

Na fase do cultivo *in vitro* se dá a evolução do oócito fertilizado, ou zigoto, ao estágio de blastocisto. Durante este momento, os zigotos sofrem

modificações como ativação do genoma embrionário, clivagem, compactação dos blastômeros no estágio de mórula e início da diferenciação embrionária com o aparecimento da blastocèle (GARCIA et al., 2004).

O ambiente atmosférico pode influenciar a qualidade embrionária, assim o aprimoramento do sistema de cultivo *in vitro* de embriões bovinos é um fator sempre questionado por diversos grupos de pesquisa (OLSON & SEIDEL, 2000; SILVA et al., 2010; CEBRIAN-SERRANO et al., 2013; SHARMA et al., 2013). Uma vez que os embriões bovinos são mantidos na CIV por sete dias, a qualidade dos mesmos está atrelada diretamente à qualidade do meio de cultivo utilizado e às condições de realização do cultivo (LONERGAN et al., 2000).

O desenvolvimento embrionário e sua viabilidade depende de oxigênio (O_2) (CLARK et al., 2006). No desenvolvimento intra-uterino, a taxa de O_2 varia entre 5 a 8%, porém na CIV, o ambiente atmosférico é de 20% de O_2 , sendo responsável pela maior formação de espécies reativas ao oxigênio (EROs) (HARVEY et al., 2002; ANDRADE et al., 2010; SILVA et al., 2010). Com o propósito de equilibrar a formação de EROs e estabilizar a fisiologia embrionária, o uso de antioxidante na PIVE é considerado necessário (ANDRADE et al., 2010; SILVA et al., 2010).

3.5 ESPÉCIES REATIVAS AO OXIGÊNIO (EROs)

As espécies reativas são compostos químicos que incluem todos os radicais e não radicais derivados do oxigênio, apresentam pelo menos um elétron não compartilhado na camada de valência, são eletronicamente instáveis e bastante reativas, tendo a capacidade de interagir com muitos compostos próximos (GUEMRA, 2014). As EROs exercem a função de agentes oxidantes, sendo receptores de elétrons, ou de agentes redutores, doando elétrons (AGARWAL et al., 2005).

Nos embriões, as EROs de maior relevância são produzidas por mecanismos fisiológicos, sendo a mitocôndria a maior geradora desse produto intracelular (SILVA et al., 2011). Esta organela é responsável por desviar aproximadamente 1 a 2% de todo seu oxigênio consumido para a formação das espécies reativas (CIRCU & AW, 2010). A maior porção da energia produzida no organismo é obtida através de fosforilação oxidativa, envolvendo cinco

complexos enzimáticos (BLIER et al., 2001). A cadeia de transporte de elétrons, caracterizada pelos complexos de I a IV, funciona através de uma série de proteínas via reações REDOX e tem como finalidade a produção de uma molécula de oxigênio. Normalmente, o O₂ é convertido em água no complexo IV, a energia produzida é estocada e usada para a produção de ATP no complexo V. Entretanto, durante tal processo, uma pequena porcentagem do oxigênio é consumida pela mitocôndria, no complexo IV, e acaba convertida em uma das várias EROs. Assim, a fosforilação oxidativa é também um dos principais responsáveis pela produção de EROs. Outras reações REDOX podem produzir espécies reativas também, como aquelas que envolvem mecanismos de defesa contra patógenos, podendo citar como exemplo a oxidase NADPH (DOWLING & SIMMONS, 2009).

O efeito prejudicial das EROs ao organismo ocorre quando há um aumento excessivo na sua produção ou quando há diminuição de agentes oxidantes. Em concentrações elevadas, as EROs causam danos ao DNA, às proteínas e aos lipídios (peroxidação lipídica) que podem culminar com o processo de apoptose (CIRCU & AW, 2010). A peroxidação lipídica leva a mudanças tanto na estrutura, quanto na permeabilidade da membrana celular, ocasionando a perda da seletividade iônica, a liberação do conteúdo das organelas e das citotoxinas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Entretanto, quando em baixas concentrações, as EROs desempenham importante papel fisiológico na PIVE, promovendo a promoção das competências dos oócitos e do desenvolvimento embrionário (GUERIN et al., 2001).

A PIVE pode produzir EROs em excesso, devido a manipulação demasiada, a exposição à luz e a alta tensão de O₂, fatores capazes de desequilibrar o mecanismo de oxirredução (ANDRADE et al., 2010). O bloqueio ou retardo do desenvolvimento embrionário, pode ser oriundo desse desequilíbrio, conseqüentemente, alterando a viabilidade dos embriões (OLSON & SEIDEL, 2000). Segundo Guemra (2014), os três principais tipos de EROs na PIVE bovina são: superóxido (O₂⁻), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e hidroxila (OH⁻).

3.6 RADICAL SUPERÓXIDO (O_2^-)

Trata-se de um radical livre, formado através da adição de um elétron ao oxigênio molecular (ANDRADE et al., 2010). Espontaneamente, ocorre sua formação em quase todas as células aeróbicas, especialmente na membrana mitocondrial, derivado da cadeia respiratória (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Por possuir pouca reatividade biológica, não tem capacidade de penetrar membranas lipídicas, dessa forma apenas age em seu local de produção (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

3.7 RADICAL HIDROXILA (OH^-)

Nos sistemas biológicos é o radical livre de maior reatividade, capaz de causar danos à célula. É formado a partir do peróxido de hidrogênio, em uma reação catalisada por íons de ferro ou cobre, conhecida por reação de Fenton (MAIA, 2006). Pode ocasionar modificações de base, quando o radical for formado próximo ao DNA e nesse estiver fixado um metal, mutando ou inativando o DNA. Além disso, o radical hidroxila é capaz de inativar diversas enzimas ao oxidar os grupos sulfidrilas (-SH) e ponte dissulfeto (-SS) (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). Este radical também pode ocasionar lipoperoxidação, provocando a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas celulares (ANDRADE et al., 2010).

3.8 PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H_2O_2)

Diferentemente das EROs supracitadas, o peróxido de hidrogênio não é um radical livre, pois não possui elétrons livres na sua camada de valência. Trata-se de um metabólito do oxigênio, altamente deletério aos sistemas biológicos, uma vez que participa na reação que produz o radical hidroxila atuando como intermediário. É formado pela ação da enzima superóxido dismutase, que transforma o radical O_2^- em H_2O_2 . Seu tempo de meia vida é longo e é capaz de atravessar membranas biológicas (NORDBERG & ARNÉR, 2001; MAIA, 2006).

3.9 ANTIOXIDANTES

Antioxidante é por definição qualquer substância, que em concentração baixa, em comparação com o componente oxidável, evita a oxidação deste (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Constitui-se de um sistema de defesa que inibe e/ou reduz os danos causados pela ação negativa dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaais (BARBOSA et al., 2010). Suplementação de meios de cultivo com substâncias antioxidantes durante a PIVE é importante para tentar minimizar os efeitos deletérios dessa exposição às EROs (GUEMRA, 2014).

O ambiente *in vivo* é rico em componentes antioxidantes, já o uso de técnicas *in vitro* acabam por expor os oócitos e embriões ao estresse oxidativo (ANDRADE et al., 2010; SILVA et al., 2010). As condições de cultura *in vitro* promovem modificações oxidativas dos componentes celulares através do aumento de EROs, que causam danos no DNA, alterações oxidativas de proteínas e peroxidação lipídica (JOHNSON & NASR-ESFAHANI, 1994). Em concentrações adequadas quando suplementados os meios de cultivo da PIVE, os antioxidantes previnem a produção de EROs, diminuindo os danos causados tanto nos oócitos quanto nos embriões (ANDRADE et al., 2010).

Os antioxidantes são classificados como enzimáticos e não enzimáticos. Os primeiros são também denominados como antioxidantes naturais, compostos pelas enzimas: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxirredoxinas (Prx), glutathione redutase (GR), glutathione peroxidase (GPx) e NADPH-quinona oxidoreductase. Essas enzimas atuam prevenindo, impedindo e/ou controlando a produção de radicais livres e espécies não-radicaais, agindo através de reações de cadeias que diminuem a ocorrência de danos oxidativos (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). Os não enzimáticos são os compostos antioxidantes de origem dietética ou sintéticos, entre os quais se destacam: vitaminas, minerais e compostos fenólicos. Atuam através de moléculas que protegem os alvos biológicos contra o estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2010). Essas moléculas atuam inibindo a formação de radicais livres, eliminando ou inativando-os, formando um produto estável, ou participando do processo de reparo (RIBEIRO et al., 2005). Como exemplos de substâncias que compõem essa classe de antioxidante: ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, licopeno luteína,

zeaxantina, zinco, cobre, selênio, magnésio, flavonóides, L-cisteína, clorofilina curcumina e proteínas do plasma (BIANCHI & ANTUNES, 1999; PRASAD et al., 2007).

3.10 ANTIOXIDANTES USADOS NA PIVE BOVINA

Inibir a produção de EROs e promover o equilíbrio de óxido redução durante a PIVE é essencial para diminuição de danos ao DNA, o que ocasiona e a apoptose celular, causadas pelo estresse oxidativo (BARCELOS et al., 2011).

A cistiamina e a insulina-transferrina-selênio (ITS) são antioxidantes não enzimáticos usados comumente como suplementos em meios de cultivo de PIVE bovina. Devido a tal fato, uma descrição sucinta de seus mecanismos antioxidantes será realizada.

3.10.1 CISTIAMINA

A suplementação do meio de cultivo com cistiamina foi testada em diversas espécies animais como bovina, bubalina, caprina, equina, suína, murina, felina e canina. As dosagens utilizadas se encontram no espectro de 50 a 500 μM , variando de acordo com a espécie (BOGLIOLO et al., 2001; CHEN et al., 2005; KOBAYASHI et al., 2007; HOSSEIN et al., 2007; BALASUBRAMANIAN & RHO, 2007; ANAND et al., 2008, ZHOU et al., 2008; DELEUZE et al., 2010).

Proveniente da degradação do aminoácido cisteína, a cistiamina é considerada um aminotiol de baixo peso molecular, sua molécula em situações *in vivo* é capaz de clivar ligações dissulfeto (DELEUZE & GOUDET, 2010). Ela está correlacionada à síntese de glutathiona (GSH), que se trata de um tiol tripeptídeo (γ -L-glutamil-L- cisteinilglicina), um componente sulfídrico não proteico das células de mamíferos, que participa de um importante papel na manutenção e regulação do estresse oxidativo (HAMMOND et al., 2001). Devido ao fato da cistiamina aumentar a síntese intracelular de GSH em bovinos, diversos grupos de pesquisa estudaram este antioxidante durante a PIVE (MATOS et al., 1995, 1997, 2002; OYAMADA & FUKUI, 2004)

Na realização da PIVE, a síntese de GSH depende da disponibilidade de cisteína presente nos meios de cultura. A cisteína em ambiente extracelular, é instável e facilmente oxidada à cistina, uma substância que apresenta um grau de toxicidade para as células (BANNAL, 1984). A capacidade da cistiamina atuar nas ligações dissulfeto reduz a cistina à cisteína, aumentando sua disponibilidade no meio de cultivo, conseqüentemente, aumentando a síntese de GSH, que está relacionada diretamente com uma melhor taxa de produção de blastocistos *in vitro* (GUERIN et al., 2001).

3.10.2 INSULINA-TRANSFERRINA-SELÊNIO

O complexo ITS é uma base comercial usada para suplementar o meio de PIVE (ALESHIRE et al., 1989). Mesmo não se tratando diretamente de um antioxidante, a transferrina do ITS tem a capacidade de quelar o radical hidroxila, atuando na diminuição do estresse oxidativo (NASR-ESFAHANI & JOHNSON, 1992). O selênio contido do complexo, quando em quantidades adequadas, atua como antioxidante enzimático, dando origem as selenoproteínas, que possuem estrutura semelhante à cisteína, com a diferença de ter um átomo de selênio no lugar do enxofre (JEONG et al., 2008). A glutathione peroxidase é um exemplo de selenoproteína, que catalisa o H₂O₂ e outras EROs, atuando na proteção das membranas celulares contra os danos oxidativos, sendo de extrema valia para a PIVE (NORDBERG & ARNER, 2001).

3.10.3 CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS E FUNÇÕES DOS FLAVONÓIDES (MIRICETINA)

Flavonóides pertencem a uma classe de compostos polifenólicos, são biossintetizados por vegetais a partir da via dos fenilpropanóides e possuem grandes propriedades no combate a radicais livres (DORNAS et al., 2007). Estão presentes na maioria das plantas, sendo concentrados em sementes, frutos, cascas, raízes, folhas e flores (FELDMANN, 2001). As principais fontes onde podem ser encontrados incluem frutas como uva, cereja, maçã, groselha, frutas cítricas, e hortaliças como pimenta, tomate, espinafre, cebola e brócolis (BARNES et al., 2001).

Já foram identificados mais de 8.000 flavonóides e sua estrutura basicamente é formada por um núcleo fundamental, constituído de quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) acoplado ao anel A (Figura 1) (DI CARLO et al., 1999; PIETTA, 2000). Trata-se de uma classe de compostos naturais, com baixo peso molecular, que diferem entre si por sua estrutura química e por características particulares. As diferenciações se dão no anel C (padrão) e tende a resultar em diferentes classes de flavonóides, tais como: flavonas, flavonóis, flavononas, dihidroflavonóis, flavonodióis, chalconas, auronas e antocianidinas. Entretanto, substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro da mesma classe (HOLLMAN & KATAN, 1999).

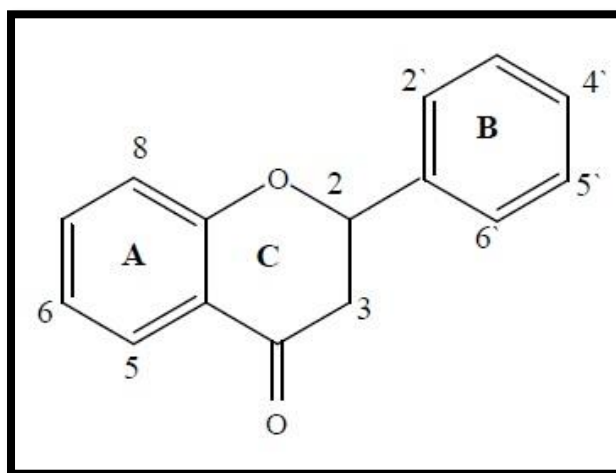


Figura 1: Estrutura básica dos flavonóides (DORNAS et al., 2007).

Os flavonóides possuem propriedades anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, cardiovasculares e antioxidantes (HE et al., 2008; LI et al., 2013, KANG et al., 2013). A estrutura química é que determina a capacidade antioxidante, as hidroxilas podem doar elétrons e suportar o deslocamento em torno do sistema aromático. Estas hidroxilas localizadas em C4 e C3, atuam no aumento do potencial antioxidante, assim a classe das agliconas (ex. quercetina, luteolina, miricetina e canferol) têm grande capacidade antioxidante, maior que de flavonóides conjugados, como a quercetina-3-glicosídica (LIEN et al., 1999; NOROOZI et al., 1998).

A miricetina (Figura 2) é um flavonoide natural, pertencente à família dos polifenóis, estruturalmente muito similar a quercetina (HUANG et al., 2010). Ambas possuem grupos hidroxila fenólicos e desempenham o papel de citoprotetor duplo, atuando como antioxidantes diretos por meio de eliminação de radicais livres, e indiretamente induzindo a produção de enzimas citoprotetoras em sistemas biológicos (QIU et al., 2018). A miricetina apresenta dados controversos quanto a sua capacidade de ação quando utilizada *in vivo* ou *in vitro*, como propriedades anticarcinogênica, pró-tumorigênica, antioxidante, pró-oxidante e ação fitoestrogênica (CHOBOT & HADACEK, 2011; SELLAPPAN & AKOH, 2002; MAGGIOLINI et al., 2005; AQUILA et al., 2013; YANG et al., 2017; RAHIMIFARD et al., 2017).

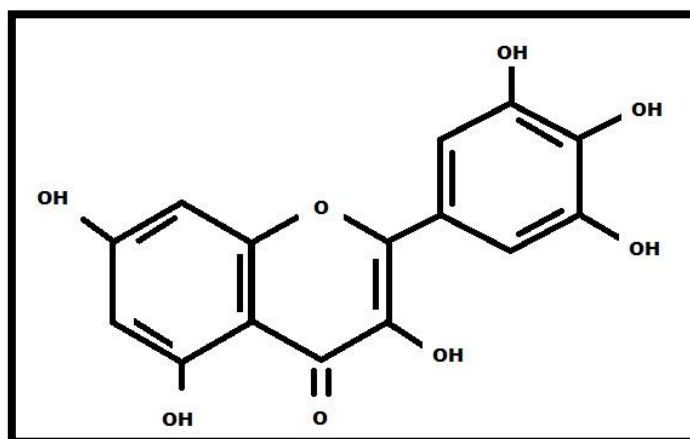


Figura 2: Estrutura química da miricetina (ALVES et al., 2007).

Pesquisas recentes em diversas áreas de conhecimento, testam a miricetina com o propósito de determinar sua maneira de atuação nos sistemas *in vivo* e *in vitro*. Arruda e colaboradores (2018) utilizaram o referido flavonóide como suplementação em meios de criopreservação de sêmen, e visualizaram efeitos deletérios oriundos de danos peroxidativos, causando mudança na cinética espermática. Yang e colaboradores (2017) chegaram à conclusão de que a miricetina suprime a invasão e promove a apoptose de células de coriocarcinomas através da indução do estresse oxidativo. Quando testada no sistema cardiovascular, observou-se a diminuição das respostas inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos através da regulação do estresse oxidativo, assim como a capacidade de inibição da produção de citocinas inflamatórias por

supressão da atividade do fator nuclear kappa B e do sinal transdutor e ativador de transcrição 1 (CHEN & FAN, 2017; CHO et al., 2016). Zhang et al. (2017) afirmaram que a mesma atenua significativamente a produção de citocinas inflamatórias induzidas por lipopolissacarídeos tanto no tecido cardíaco, como na circulação sanguínea e nos macrófagos.

Inibir a produção de EROs e promover o equilíbrio de oxidação e redução durante a PIVE é essencial para diminuição de danos ao DNA, o que ocasiona e a apoptose celular, causadas pelo estresse oxidativo (BARCELOS et al., 2011). Desta forma, faz-se necessário determinar se a miricetina auxilia nas taxas de maturação oocitária favorecendo a obtenção de embriões no processo de produção *in vitro*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL, A.; GUPTA, S.; SHARMA, R. K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive Biology Endocrinology**, v.3, n.28, p.1–21, 2005.
- ALESHIRE, S. et al. Localization of transferrin and its receptor in ovarian follicular cells: morphologic studies in relation to follicular development. **Fertility and sterility**, v. 51, n. 3, p. 444, 1989. ISSN 0015-0282.
- ALVES, C.Q.; BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; LIMA, L.S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência**, ano V, n. 12, dez. 2007. ISSN 1678-0493.
- ANAND, T.; KUMAR, D.; CHAUHAN, M.S.; MANIK, R.S.; PALTA, P. Cysteamine supplementation of in vitro maturation medium, in vitro culture medium or both media promotes in vitro development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reprod. Fertil. Dev.**, v.20, p.253–257, 2008.
- ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. 2010.
- ANDRADE, R.G.; BOLFE, E.L.; BATISTELLA, M. Sustentabilidade da bovinocultura. **Revista Agroanalysis**, v. 35, n. 1, p. 29-31, 2015.

AQUILA, S.; SANTORO, M.; AMICIS, F. et al. Red wine consumption may affect sperm biology: the effects of different concentrations of the phytoestrogen myricetin on human male gamete function. **Mol. Reprod. Dev.**, v.80, p.155-165, 2013.

ARRUDA, L.C.P.; ARAÚJO SILVA, R.A.J.; MONTEIRO, M.M.; SILVA, R.P.F.; OLIVEIRA, A.S.; MERGULHÃO, F.C.C.; MONTEIRO JR, P.L.J.; BATISTA, A.M.; GUERRA, M.M.P. Avaliação in vitro do sêmen congelado de carneiros com diluidor suplementado com miricetina. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.70, n.1, p.153-159, 2018.

BALASUBRAMANIAN, S.; RHO, G.J. Effect of cysteamine supplementation of in vitro matured bovine oocytes on chilling sensitivity and development of embryos. **Anim Reprod Sci**, v.98, p.282–292, 2007.

BANNAI, S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 779, p.289–306, 1984.

BARBOSA, K.B.F.; COSTA, N.M.B.; ALFENAS, R.C.G.; DE PAULA, S.O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, 23(4):629-643, jul./ago., 2010.

BARCELOS, G.R.M.; ANGELI, J.P.F.; SERPELONI, J.M.; GROTTTO, D.; ROCHA, B.A.; BASTOS, J.K.; KNASMÜLLER, S. JÚNIOR, F.B. Quercetin protects human-derived liver cells against mercury-induced DNA-damage and alterations of the redox status. **Mutat. Res.**, v. 726, p.109-115, 2011.

BARNES, J.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.53, n.5, p.583-600, 2001.

BATISTELLA, M.; BOLFE, E. L.; VICTORIA, D. C.; CUSTODIO, D. O.; SILVA, G. B. S.; DRUCKER, D. P. SOMABRASIL: Sistema de Observação e Monitoramento da Agricultura no Brasil. **Campinas: Embrapa Monitoramento por Satélite**, 2012. 11 p. (Comunicado Técnico, 29). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/939076/somabrasil-sistema-de-observacao-e-monitoramento-da-agriculturano-brasil>>. Acesso em: 23 set. 2017

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr.**, v.12, n.12, p.123-30, 1999. doi: 10.1590/S1415-52731999000200001.

BLIER, P.U.; DUFRESNE, F; BURTON, R.S. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. **Trends Genet**, v.17, p. 400-406, 2001.

BOGLIOLO, L.; LEONI, G.; LEDDA, S.; NAITANA, S.; ZEDDA, M.; CARLUCCIO, A.; PAU, S. Intracytoplasmic sperm injection of in vitro matured oocytes of domestic cats with frozen–thawed epididymal spermatozoa. **Theriogenology**, v. 56, p. 955–967, 2001.

BUENO, A.P.; BELTRAN, M.P. Produção in vitro de embriões bovinos. Revista científica eletrônica de medicina veterinária – ISSN: 1679-7353 **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, ano 6, n. 11, Jul/2008.

CARNEIRO, G. F.; SILVA, S. V.; MEDEIROS, L. R. D.; GOMES NETO, O. C.; PROCÓPIO, O. C. S. Utilização Prática de Sêmen Congelado. **In: I Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos**, 2007, Gravata - PE. 2007.

CEBRIAN-SERRANO, A.; SALVADOR, I.; SILVESTRE, M. Beneficial Effect of Two Culture Systems with Small Groups of Embryos on the Development and Quality of In Vitro Produced Bovine Embryos. **Anatomia, histologia, embryologia**, 2013. ISSN 1439-0264.

CHAVES, R. et al. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 34, n. 1, p. 37- 49, 2010. ISSN 0102-0803.

CHEN, N.; LIOW, S.L.; YIP, W.Y.; TAN, L.G.; NG, S.C. Influence of cysteamine supplementation and culture in portable dryincubator on the in vitro maturation, fertilization and subsequent development of mouse oocytes. **Theriogenology**, v. 63, p. 2300–2310, 2005.

CHEN, S.; FAN, B. Myricetin protects cardiomyocytes from LPS induced injury. **Herz**, v.43, n.3, p. 265-274, 2017.

CHO, B.O.; YIN, H.H.; PARK, S.H.; BYUN, E. B.; HA, H.Y.; JANG, S. I. Anti-inflammatory activity of myricetin from Diospyros Lotus through suppression of NF-kappaB and STAT1 activation and Nrf2-mediated HO-1 induction in

lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 macrophages. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v.80, p.1520–1530, 2016.

CHOBOT, V.; HADACEK, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. **Redox. Rep.** v.16, p.242–247, 2011.

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

CLARK, A. et al. Mathematical modelling of oxygen concentration in bovine and murine cumulus–oocyte complexes. **Reproduction**, v. 131, n. 6, p. 999- 1006, 2006. ISSN 1470-1626.

DELEUZE, S.; DUBOIS, C.S.; CAILLAUD, M.; BRUNEAU, B.; GOUDET, G.; DUCHAMP, G. Influence of cysteamine on in vitro maturation, in vitro and in vivo fertilization of equine oocytes. **Reproduction Domestic Animals**, v. 45, p. 1–7, 2010.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine Supplementation of In vitro Maturation Media: A Review. **Reproduction Domestic Animals**, v. 45, p.476–482, 2010. Doi: 10.1111/j.1439-0531.2010.01587.x ISSN 0936-6768.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, n. 4, p.337-353, 1999.

DODE, M.A.N. Fecundação in vitro: para o melhoramento animal. **Pesquisa Agropecuária. Brasileira**, Brasília. 2004. Disponível em: <http://portaledit.sct.embrapa.br/imprensa/artigos/2000/artigo.2004-12-7.2439664009>. Acesso em 3 fev. 2018.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 276, n. 1663, p. 1737-1745, 2009. ISSN 0962-8452.

EDWARDS, J.L.; SAXTON, A.M.; LAWRENCE, J.L.; PAYTON, R.R.; DUNLAP, J.R. Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens in vitro maturation in bovine oocytes. **J Dairy Sci**, v.88, p.4326-4333, 2005.

FELDMANN, K.A. Cytochrome P450s as genes for crop improvement. ***Curr Opin Plant Biol***, v. 4, p.162-167, 2001.

FERREIRA, A.; MATSUBARA, L. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. ***Revista da Associação Médica Brasileira***, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. ISSN 0104-4230.

FISSORE, R.A. et al. Mechanisms underlying oocyte activation and postovulatory ageing. ***Reproduction***, v. 124, n. 6, p. 745-754, 2002. ISSN 1470-1626.

GARCIA, J.; AVELINO, K.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização in Vitro em bovinos. ***Annals of the First International Symposium on Animal Reproduction Applied***: 14-16 October 2004; Londrina, 2004. 223-230 p.

GONÇALVES P.B.D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES P.B.D., FIGUEIREDO J.R., FREITAS V.J.F. ***Biotécnicas aplicadas à reprodução animal***. São Paulo: Livraria Varela, 2002. p. 179-194.

GONÇALVES, P. B. D.; BARRETA, M. H.; SANDRI, L. R.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. ***Revista Brasileira de Reprodução Animal***. v.31, p.212-217, 2007.

GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.de F. ***Biotécnicas aplicadas à reprodução animal***: São Paulo- SP. Varela. 2002. 340p.

GUEMRA, S. ***Efeito da quercetina sobre a produção in vitro de embriões bovinos***. 2014. Dissertação (Mestrado em saúde e produção de ruminantes) - Centro de Pesquisa em Ciências Agrárias, Universidade do Norte do Paraná, Araçongas.

GUERIN, P.; EL MOUATASSIM, S.; MENEZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. ***Human Reproduction Update***, v. 7, n. 2, p. 175-189, 2001. ISSN 1355-4786.

HAFEZ, E.; HAFEZ, B. Foliculogênese, maturação ovocitária e ovulação. HAFEZ, ESE; HAFEZ, B. ***Reprodução Animal***. 7ª ed. São Paulo: Manole, p. 69-81, 2004.

HAMMOND, C.L.; LEE, T.K.; BALLATORI, N. Novel roles for glutathione in gene expression, cell death, and membrane transport of organic solutes. ***Journal of Hepatology***, v. 34, p. 946–954, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, Oxford, 1999.

HARDY, K. et al. In vitro maturation of oocytes. **British Medical Bulletin**, v. 56, n. 3, p. 588-602, 2000. ISSN 0007-1420.

HARVEY, A.J.; KIND, K.L.; THOMPSON, J.G. REDOX regulation of early embryo development. **Reproduction**, 2002, v. 123, p. 479-486.

HE S.; SUN, C.; PAN, Y. Red wine polyphenols for câncer prevention. **International Journal of Molecular Science**, v. 9, p.842–853, 2008.

HOLLMAN, P. C. H.; KATAN, M. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 937-942, 1999. ISSN 0278-6915.

HOSSEIN, M.S.; KIM, M.K.; JANG, G.; OH, H.J.; KOO, O.; KIM, J.J.; KANG, S.K.; LEE, B.C.; HWANG, W.S. Effects of thiol compounds on in vitro maturation of canine oocytes collected from different reproductive stages. **Mol Reprod Dev** v.74, p.1213– 1220, 2007.

HUANG, J.; HUANG, C.; FANG, J. et al. Protective effects of myricetin against ultraviolet- B-induced damage in human keratinocytes. **Toxicology in vitro**, v. 24, p. 21–28, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Pesquisa Pecuária Municipal. 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin.>> Acesso em: 05 set. 2017.

IRITANI, A. NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization of cattle follicular oocytes matured in culture. **J. of Reprod. Fertility**. v.50, p.119-121, 1977.

JEONG, Y. W. et al. Effects of insulin–transferrin–selenium in defined and porcine follicular fluid supplemented IVM media on porcine IVF and SCNT embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 106, n. 1, p. 13-24, 2008. ISSN 0378-4320.

JOHNSON, M.H.; NASR-ESFAHANI, M.H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos in vitro? **Bioessays**, v. 16, p. 31–38, 1994.

KANG, J.T.; KWON, D.K.; PARK, S.J.; KIM, S.J.; MOON, J.H.; KOO, O.J.; JANG, G.; LEE, B.C. Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. **Journal of Veterinary. Science**, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2013.

KOBAYASHI, M.; ASAKUMA, S.; FUKUI, Y. Blastocyst production by in vitro maturation and development of porcine oocytes in defined media following intracytoplasmic sperm injection. **Zygote**, v.15, p. 93–102, 2007.

LI, Y. et al. Quercetin protects rat hepatocytes from oxidative damage induced by ethanol and iron by maintaining intercellular liable iron pool. **Human & Experimental Toxicology**, 2013. ISSN 0960-3271.

LIEN, E.J.; REN, S.; BUI, H.H.; WANG, R. Quantitative structureactivity relationship analysis of phenolic antioxidants. **Free Radic. Biol. Med.**, v.26, n.3-4, p.285-94, 1999.

LIN, T.; OQANI, R.K.; LEE, J.E.; SHIN, H.Y.; JIN, D.I. Coculture with good-quality COCs enhances the maturation and development rates of poor-quality COCs. **Theriogenology**, v. 85, p.396–407, 2016.

LONERGAN, P. et al. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF1 growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 2, p. 146-152, 2000. ISSN 1098 - 2795.

MAIA, M.S. ***Viabilidade espermática e geração de metabólitos Reativos do Oxigênio (ROS) no semen ovino criopreservado em diluidor aditivado de Lauril Sulfato de Sódio (OEP), Trolox-C e Catalase.*** 2006. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Botucatu, 2006.

MAGGIOLINI, M.; RECCHIA, A.G.; BONOFIOLIO, D. et al. The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor α in human breast cancer cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 35, p. 269–281, 2005.

MAO L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic ganelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reprod Biomed Online**, v.28, p.284-299, 2014.

MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F. Glutathione synthesis during in vitro maturation of bovine oocytes: role of cumulus cells. **Biol. Reprod.**, v. 57, p.1420–1425, 1997.

MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; BALDASSARRE, H. Effect of cysteamine on glutathione level and developmental capacity of bovine oocyte matured in vitro. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 42, p. 432–436, 1995.

MATOS, D.G.; HERRERA, C.; CORTVRINDT, R.; SMITZ, J.; VAN SOOM, A.; NOGUEIRA, D.; PASQUALINI, R.S. Cysteamine supplementation during in vitro maturation and embryo culture: a useful tool for increasing the efficiency of bovine in vitro embryo production. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 62, p. 203–209, 2002,

MÁXIMO, D.M. **Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação in vitro**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

MEIRELLES, F.V. et al. Perspectivas para as técnicas de FIV, clonagem e transgenia. In: **Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**, 3, 2008, Londrina-PR. p.195-205, 2008.

MERTON, J.S.; KNIJN, H.M.; FLAPPER, H.; DOTINGA, F.; ROELEN, B.A.J.; VOS, P.L.A.M.; MULLAART, E. Cysteamine supplementation during in vitro maturation of slaughterhouse- and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v. 80, p 365–371, 2013.

NASR-ESFAHANI, M.H.; JOHNSON, M.H. Quantitative analysis of cellular glutathione in early preimplantation mouse embryos developing in vivo and in vitro. **Hum. Reprod.**, v. 7, p. 1281-1290, 1992.

NEVES, J.P.; MIRANDA, K.L.; TORTORELLA, R.D. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **R. Bras. Zootec.**, v.39, p.414-421, 2010 (supl. especial).

NORDBERG, J.; ÁRNER, E.S.J. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v.31, p.1287-1312, 2001.

NOROOZI, M.; ANGERSON, W.J.; LEAN, M.E. Effects of flavonoids and vitamin C on oxidative DNA damage to human lymphocytes. **Am. J. Clin. Nutr.**, v.67, n.6, p.1210-1218, 1998.

OLSON, S.; SEIDEL, G. Culture of in vitro-produced bovine embryos with vitamin E improves development in vitro and after transfer to recipients. **Biology of reproduction**, v. 62, n. 2, p. 248-252, 2000. ISSN 0006-3363.

OYAMADA, T.; FUKUI, Y. Oxygen tension and médium supplements for in vitro maturation of bovine oocytes cultured individually in a chemically defined medium. **J. Reprod. Dev.**, v. 50, p.107–117, 2004.

PADILHA, L. C. **Santa inês submetidas a sucessivas sessões de aspiração folicular por videolaparoscopia**. 2012. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

PENITENTE FILHO, J.M. In: **Produção de embriões bovinos in vivo e in vitro**. Viçosa-MG. 2011. 21p.

PIETTA G. Flavonoids as antioxidants. **Journal Nat. Prod.**, v.63, p.1035-1042, 2000.

PRASAD, A.S.; BECK, F.W.J.; BAO, B.; FITZGERALD, J.T.; SNELL, D.C.; STEINBERG, J.D. et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **American Journal of Clinic Nutrition**, v. 85, n.3, p. 837-44, 2007.

QIU, R.; WANG, J.; PARKIN, K.L. Activity-guided isolation of phase II enzyme inducers from buckwheat flour methanolic extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.9023>

RAHIMIFARD, M.; MAQBOOL, F.; MOEINI-NODEH, S.; NIAZ, K.; ABDOLLAHI, M.; BRAIDY, N.; NABAVI, S. F. Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation. **Ageing Research Reviews**, v. 36, p. 11–19, 2017.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133-149, 2005. ISSN 1981-3163.

SANTOS, S. D. S. D. et al. Cinética da maturação nuclear in vitro de oócitos bubalinos. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 39, n. 5, p. 266-270, 2002. ISSN 1413-9596.

SCHNEIDER, C.D.; OLIVEIRA, A.R. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**, v.10, n.10, p.308-13, 2004.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C. Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia-grown *Vidalia* onions. **J. Agric. Food. Chem.** v.50, p. 5338–5342, 2002.

SHARMA, A. K. et al. Purification of heparin binding oviduct specific proteins and its effect on in vitro embryo development in cattle. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 51, n. 5, p. 347-351, 2013. ISSN 0019-5189.

SILVA, C. et al. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo in vitro de folículos e embriões. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 34, n. 4, p. 233-242, 2010. ISSN 0102-0803.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE A.B.G. *et al.* Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, p.315-326, 2011.

SOLAK, K.A.; SANTOS, R.R.; VAN DEN BERG, M., BLAAUBOER, B.J.; ROELENC, B.A.J.; VAN DUURSEN, M.B.M. Naringenin (NAR) and 8-prenylnaringenin (8-PN) reduce the developmental competence of porcine oocytes in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 49, p. 1–11, 2014.

VIANA, J.H.M.; CAMARGO, L.S.A. A produção de embriões bovinos no Brasil: uma nova realidade. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.3, p. s915-s924, 2007 (supl.3).

YANG, C.; LIM, W.; BAZER, F.W.; SONG, G. Myricetin suppresses invasion and promotes cell death in human placental choriocarcinoma cells through induction of oxidative stress. **Cancer Letters**, v. 399, p. 10 – 19, 2017.

YOUNG, L.E., SINCLAIR, K.D., WILMUT, I. Large offspring syndrome in cattle and sheep. **Rev. Reprod.**, v.3, p.155-163, 1998.

ZHANG, N.; FENG, H.; LIAO, H.H.; CHEN, S.; YANG, Z; DENG, W.; TANG, Q.Z. Myricetin attenuated LPS induced cardiac injury in vivo and in vitro. **Phytother Res.**, v. 32, n.3, p.459-470, 2017.

ZHENGQUANG, W.; CHUNQUAN, F.; SONGDONG, Y. Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of

bovine oocytes in vitro. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p. 1079-1085, 2007.

ZHOU, P.; WU, Y.G.; LI, Q.; LAN, G.C.; WANG, G.; GAO D.; TAN, J.H. The interactions between cysteamine, cystine and cumulus cells increase the intracellular glutathione level and developmental capacity of goat cumulus-denuded oocytes. **Reproduction**, v.135, p.605–611, 2008.

5. ARTIGO

ACÇÃO DA MIRICETINA NA MATURAÇÃO IN VITRO DE OÓCITOS BOVINOS

RESUMO

Nos sistemas *in vitro* de produção de embriões (PIVE), a maturação oocitária (MIV) é um dos passos limitantes, inclusive devido à agressão de EROs produzidas no sistema. A miricetina é um dos flavonoides naturais, conhecida por seu potencial antioxidante, que pode proporcionar avanços na PIVE, sendo suplementada no meio de MIV. Com o objetivo de testar os efeitos da miricetina sobre a MIV de bovinos, oócitos foram maturados por 24 h na presença (1, 5 e 10 μM) ou na ausência (grupo controle) de miricetina. Os oócitos foram corados com *Hoechst* e visualizados em microscópio de fluorescência para avaliação nuclear. A percentagem de maturação nuclear não diferiu entre os grupos controle (64,5%), e tratamentos 1 μM (66,9%) e 5 μM (70,8%), porém o tratamento com 10 μM (42,7%) mostrou-se desfavorável para os oócitos. Quanto à avaliação do desenvolvimento embrionário, os oócitos foram fertilizados e cultivados *in vitro*, sendo as taxas de desenvolvimento embrionário determinadas no sétimo dia de cultivo. Na fase de produção de embriões foi-se testado apenas o tratamento controle e o 1 μM de miricetina, onde não houve variação significativa ($P > 0,05$) nas as taxas de desenvolvimento embrionário, entre o grupo controle (47,2%) e o tratamento 1 μM (33,3%). Os embriões produzidos foram corados pela técnica do TUNEL, a fim de avaliar sinais de apoptose celular, revelando que, o grupo tratamento 1 μM apresenta menor taxa de blastômeros apoptóticos (27%), quando comparados ao grupo controle (41,2%) ($P < 0,05$). Conclui-se que a suplementação da maturação *in vitro* com antioxidante miricetina em dose de 10 μM de miricetina interfere na taxa de maturação oocitária, já quanto a produção embrionária, o uso de 1 μM de miricetina não interfere a taxa de produção de blastocistos e diminui o número de blastômeros apoptóticos.

MYRICETIN ACTION ON THE IN VITRO MATURATION OF BOVINE OOCYTES

ABSTRACT

In the *in vitro* embryo production systems (PIVE), culture maturation (IVM) is one of the limiting steps, specially due to the action of EROs produced in the system. Myricetin is one of the natural flavonoids, known for its antioxidant potential, which may improve the PIVE, being supplemented in the medium of IVM. In order to test the effects of myricetin on bovine IVM, oocytes were matured for 24 h in the presence (1, 5 and 10 μM) or in the absence (control group) of myricetin. The oocytes were stained with Hoechst and visualized under a fluorescence microscope for nuclear evaluation. The percentage of nuclear maturation did not differ between the control group (64.5%), and treatments 1 μM (66.9%) and 5 μM (70.8%), but treatment with 10 μM (42.7%) was damaging for oocytes. Regarding the evaluation of the embryonic development, the oocytes were fertilized and cultured *in vitro*, being the embryonic development rates determined after 7 days

of culture. In the embryo production phase, only myricetin 1 μ M was used. Relative to embryonic development rates, there was not difference ($P > 0.05$) between control group (47.2%) and treatment 1 μ M (33.3%). The embryos were stained by the TUNEL technique, in order to evaluate cell apoptosis signs, revealing that the myricetin 1 μ M treatment resulted in a lower rate of apoptotic blastomers (27%) when compared to the control group (41.2%) ($P < 0.05$). It was concluded that the IVM supplementation with 10 μ M myricetin interferes in oocyte maturation rate, however, 1 μ M myricetin does not interfere in the rate of blastocyst production and decreases the number of apoptotic blastomers.

Keywords: antioxidant, blastocyst and *Terminal Deoxynucleotil Transferase Uracil Nick End Labeling*.

1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura é um mercado em expansão, possuindo grande importância na produção mundial de leite e de carne (BATISTELLA et al., 2012), sendo estimado em 218,23 milhões de cabeças de bovinos (IBGE, 2016). Neste contexto, diversos são os desafios para a melhoria e manutenção da qualidade genética dos animais, demandando esforços técnico-científicos multidisciplinares (ANDRADE et al., 2015). Dentre estes, a utilização de biotécnicas reprodutivas em concordância com programas de melhoramento genético, auxiliam na produção de animais com melhores padrões zootécnicos (CARNEIRO et al., 2007).

Uma das biotécnicas usadas para a multiplicação eficiente dos rebanhos é a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (MÁXIMO, 2009). Esta é dividida nas etapas de maturação *in vitro* (MIV), fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), que possuem a capacidade de otimizar a obtenção de embriões e, conseqüentemente, nascimentos de produtos viáveis (GONÇALVES et al., 2002). Para se obter melhores taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário faz-se necessário obter primordialmente boas taxas de MIV, uma vez que tanto a maturação citoplasmática quanto a nuclear garantem ao oócito a capacidade de poder ser fecundado e evoluir até o estágio embrionário (PADILHA, 2012).

A MIV é fator limitante para todo o processo da PIVE, pois *in vivo* há fatores de crescimento e hormônios que atuam nos processos de ativação, crescimento, diferenciação, maturação e atresia folicular (PADILHA, 2012). Além

disso, nos sistemas *in vitro*, os níveis de antioxidantes são mais baixos, expondo os oócitos à ação das espécies reativas ao oxigênio (EROs). Diversos antioxidantes estão sendo utilizados como suplementação de meio de cultivo para aumentar os índices de desenvolvimento embrionário (KANG et al., 2009), mas poucas pesquisas vêm sendo feitas com uso de flavonóides para esta finalidade (KANG et al., 2016). Tal fato, fomenta o interesse científico a respeito dessa classe de antioxidantes naturais e de grande poder contra as EROs (BEHLING et al., 2004, KANG 2016).

Os meios de cultivo da PIVE, especialmente da MIV, precisam ser suplementados com antioxidantes que previnem a produção de EROs, diminuindo os danos causados tanto nos oócitos quanto nos embriões (ANDRADE et al., 2010). A miricetina é um flavonóide natural, pertencente à família dos polifenóis (HUANG et al., 2010) que desempenha o papel de citoprotetor duplo, atuando como antioxidantes diretos por meio de eliminação de radicais livres, e indiretamente induzindo a produção de enzimas citoprotetoras em sistemas biológicos (QIU, 2018). Assim a suplementação do meio de cultivo com compostos polifenólicos derivados de plantas, pode vir a ser importante opção para a maturação *in vitro* de oócitos (ZHENG GUANG, et al., 2007). Neste estudo, objetivou-se usar a miricetina como suplemento do meio de maturação oocitária, a fim de obter avanços para a MIV bovina, visto que o mesmo ainda não foi testado nesta espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local dos experimentos

Os experimentos foram realizados entre os meses de abril a junho de 2018, na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), localizada no município de Arcoverde, e no Laboratório de Andrologia Animal (ANDROLAB) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, situado na cidade do Recife.

2.2 Coleta dos ovários e maturação *in vitro*

Foram coletados ovários de vacas (*Bos taurus* e *Bos indicus*) adultas, abatidas nos matadouros comerciais do estado de Pernambuco. Os ovários

foram transportados ao laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal do IPA, acondicionados em soro fisiológico acrescido de gentamicina (10 mg/ml), na temperatura de 37 °C. Folículos antrais (> 3 mm) foram aspirados utilizando seringas estéreis de 10 mL e agulhas hipodérmicas (40 x 1,20mm). O líquido folicular foi armazenado em tubos cônicos, para a sedimentação dos complexos cumulus-oócitos (COCs) por até 10 min. O sobrenadante foi desprezado e o pellet de COCs foi ressuscitado em tampão fosfato salino (PBS), previamente aquecido a 37 °C, e a solução foi transferida para placa de Petri (90 x 15 mm). Os oócitos foram então recuperados do fluído folicular, sendo separados e lavados três vezes em meio de lavagem (TCM-HEPES 199 - Sigma® M7528, Soro Fetal Bovino - Gibco® 10082147, *Glutamax* 100x - Gibco® 35050061). Foram selecionadas apenas COCs com citoplasma homogêneo e com no mínimo três camadas de células do *cumulus*, sendo, então, lavados e colocados em gotas de 100 µL de meio de maturação (TCM 199 - Sigma® M2154, gentamicina - 5 mg/mL, piruvato de sódio - 2,2 mg/mL, *Glutamax* 100x - Gibco® 35050061, Soro Fetal Bovino, FSH - 20 mg/mL) em placas de Petri de 35mm (NUNC®, Roskilde, Dinamarca). As gotas foram cobertas com óleo mineral e incubadas por 24h a 38,5°C em atmosfera úmida com 5% CO₂. Foram realizadas quatro repetições, totalizando 820 oócitos distribuídos em quatro tratamentos (0, 1, 5 e 10 µM/ml de miricetina), sendo colocados em média 20 oócitos por gota.

2.3 Determinação do estágio meiótico

Após o período de maturação, os COCs foram lavados três vezes em gotas de 100 µL de meio de maturação, posteriormente foram desnudados em uma gota de 100 µL de hialuronidase (10.000 UI/mL) por aspirações repetitivas. Uma vez desnudos, os oócitos foram corados com *Hoescht* 33342 em PBS por 20 min em temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, foram lavados em três gotas de 100 µl de PBS acrescido de 1% SFB. Logo, os oócitos foram transferidos para lâmina de microscopia com meio de montagem ProLong® Gold (Molecular Probes, Life Technologies), sendo recobertos por lamínula, selados com esmalte incolor e examinados em microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Inc., Göttingen, Alemanha), em comprimento de onda de 330 – 385 nm. A classificação dos oócitos foi de acordo com a configuração

nuclear, em vesícula germinativa (GV), ruptura da vesícula germinativa (GVBD), metáfase I (MI) e metáfase II (MII). Sendo os resultados analisados pelo teste do Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%.

2.4 Fertilização e cultivo *in vitro*

Os meios de cultura (capacitação, fertilização e cultivo) foram adquiridos em laboratório comercial. A MIV foi repetida com 397 oócitos, distribuídos em dois tratamentos (0 e 1 $\mu\text{M/ml}$ de miricetina) e em quatro repetições. Na FIV, foi utilizado sêmen convencional de um único touro, proveniente de laboratório comercial, descongelado à 37°C por um minuto. Os espermatozóides foram selecionados pelo método de gradiente descontínuo de Percoll a 90% conforme descrito por Nascimento e colaboradores (2015). A dose inseminante foi de $2,0 \times 10^6$ sptz/mL. A incubação dos oócitos/espermatozóides foi conduzida em gotas de 100 μL de meio FERT-TALP, por 18 horas em estufa de cultivo a 38,5°C com 5% de CO_2 em ar e umidade saturada.

Após a etapa de fertilização os possíveis zigotos foram lavados em três gotas de 100 μL do meio de cultivo, SOF (do inglês, *Synthetic Oviduct Fluid*), e transferidos para placas com gotas de 100 μL do mesmo meio, recobertas com óleo mineral estéril e incubados em atmosfera de 5% de CO_2 e 38,5°C por 7 dias com umidade saturada. Após 48 horas do início do cultivo (D2) foi realizada avaliação da taxa de clivagem. No sétimo dia (D7) foi avaliado o percentual de blastocistos, que foram retirados do meio SOF e fixados em paraformaldeído a 4% por 30 min, depois lavados em três gotas de 100 μL de PBS, e acondicionados em tubos de 500 μL com meio SOF a 4°C.

2.5 Coloração TUNEL

Os sinais de apoptose foram verificados pela técnica de coloração TUNEL (do inglês, *Terminal Deoxynucleotil Transferase Uracil Nick End Labeling*) através do Kit “*In Situ Cell Death Detection Kit Fluorescein*” (Roche®, Alemanha).

Após serem fixados, os embriões foram lavados três vezes em PBS contendo 0,3% de polivinilpirrolidona (PVP) e permeabilizados em Triton X-100 à 0,5% em câmara úmida, a temperatura ambiente, por 30 minutos. Os embriões foram lavados três vezes em solução PBS/PVP e foram incubados em gotas de 50 μL da mistura de reagentes de TUNEL do *kit*, contendo a proporção de 10% de solução enzimática (enzima terminal deoxinucleotídeo transferase) com 90%

de solução marcadora (conjugado fluorescente de dUTP) por 1 hora a temperatura ambiente no escuro, também em câmara úmida. Foram lavados por quatro vezes em PBS/PVP, e então corados com solução Hoechst 33342 por 20 minutos. Novamente, lavados por cinco vezes em PBS/PVP, sendo colocados em lâminas histológicas com lamínulas e para análise em microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan (Carl Zeiss, Inc., Göttingen, Alemanha). As imagens foram obtidas pelo programa e pela câmera digital AxioCam MRm (Carl Zeiss, Inc., Göttingen, Alemanha), sendo avaliadas pelo programa IMAGEJ®, em conformidade com Bonilla (2008).

A taxa de produção de blastocisto foi expressa em percentagem, sendo baseada no número de embriões que foram fertilizados e sofreram clivagem. Os resultados foram analisados pelo teste do Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS

No estudo inicial de MIV, foram utilizados 820 oócitos, distribuídos em quatro tratamentos e quatro repetições (Tab. 1). Após a aspiração folicular todos os oócitos estavam na fase de vesícula germinativa (VG) e o percentual de oócitos que completaram a maturação nuclear atingindo a fase de metáfase II (MII) foi significativamente menor ($P < 0,05$) no grupo que recebeu tratamento de 10 μM de miricetina.

Tabela 1 - Efeito da miricetina sobre a maturação de oócitos bovinos.

Tratamento	Oócitos Nº	VG Nº	VGBD Nº	MI Nº	MI Nº	Taxa de Maturação
Controle	209	22	10	42	135	64,5%a
Miricetina 1 μM	227	23	5	47	152	66,9%a
Miricetina 5 μM	192	12	3	41	136	70,8%a
Miricetina 10 μM	192	25	7	78	82	42,7%b

VG – vesícula germinativa; VGBD – ruptura da vesícula germinativa; MI – metáfase I; MII – metáfase II. ab – letras diferentes na coluna representam diferença significativa ($P < 0,05$).

Para realização da FIV, foram utilizados 264 oócitos, distribuídos em dois tratamentos e quatro repetições, os quais estão descritos na Tab. 2. Pela análise dos resultados, as taxas de clivagem e de desenvolvimento embrionário foram similares entre os grupos ($P > 0,05$) (Tab. 2).

Tabela 2 - Uso da miricetina na maturação *in vitro* e seu efeito para a competência do desenvolvimento embrionário.

Tratamento	Oócitos Nº	Clivagem D2	Blastocisto D7
Controle	131	72(54,9%)a	34 (47,2%)a
Miricetina 1 μM	133	60(45,1%)a	20 (33,3%)a

D2 – dia dois do cultivo; D7 – dia sete do cultivo. a – letras iguais na coluna representam ausência de diferença significativa ($P < 0,05$).

Para análise de células apoptóticas, através da técnica de TUNEL, 44 embriões foram fixados, mostrando marcação dos blastômeros com DNA danificado em verde, e dos blastômeros com DNA íntegro em azul. O índice apoptótico por blastocisto está demonstrado na Tab. 3, onde observa-se uma maior quantidade de blastômeros íntegros no grupo tratado com 1 μ M de miricetina, obtendo-se uma menor ($P < 0,05$) taxa de apoptose celular, quando comparada ao grupo controle.

Tabela 3: Número total de blastômeros, número de blastômeros apoptóticos e taxa de apoptose em embriões bovinos avaliados através da técnica de TUNEL.

Tratamento	Nº blastocistos fixados	Nº total de blastômeros	Nº blastômeros apoptóticos	Tx apoptose %
Controle	24	4003	1651	41,24a
Miricetina 1 μM	20	3256	881	27,05b

ab – letras diferentes na coluna representam diferença significativa ($P < 0,05$).

4. DISCUSSÃO

No presente estudo, foi avaliado o efeito de diferentes concentrações de miricetina sobre a taxa de maturação *in vitro* de oócitos bovinos. As concentrações, 1, 5 e 10 μ M, foram utilizadas tendo como referência o trabalho

realizado com quercetina na espécie bovina (GUEMRA et al., 2013), devido à ausência de dados publicados sobre o uso da miricetina na PIVE de qualquer espécie. Quanto a taxa de maturação nuclear, as concentrações de 1 e 5 μM apresentaram resultado similar ao grupo controle, porém a concentração de 10 μM diminuiu significativamente esta taxa, demonstrando que a depender da concentração, a miricetina pode agir negativamente sobre maturação oocitária em bovinos. Esses dados estão em conformidade com outros estudos que demonstraram que altas concentrações de quercetina (50 μM) proporcionam diminuição da taxa de maturação oocitária em suínos e bovinos (KANG et al., 2013; GUEMRA et al., 2013).

Alguns compostos antioxidantes já foram utilizados como suplementos de meios de maturação em diversas espécies animais além da quercetina supracitada, como narigerina, genesteína, cistiamina, taxifolina e astaxantina, obtendo-se resultados tanto positivos quanto negativos a níveis experimentais, dessa forma cada antioxidante pode atuar de maneira própria na PIVE (GUEMRA et al., 2013; SOLAK et al., 2014; KANG et al., 2016; ISPADA et al., 2018).

A realização do teste dose-efeito teve o intuito de guiar a escolha da concentração que foi utilizada na produção de embriões. Os resultados, quanto a taxa de clivagem, não demonstraram diferenças significativas entre os grupos controle e 1 μM . Quanto a taxa de obtenção de blastocistos, também se observou que a desenvoltura do grupo tratado com miricetina é similar ao grupo controle. A literatura discorre sobre a importância do uso de antioxidantes na PIVE, uma vez que é essencial para a maturação citoplasmática dos oócitos, estando ligado diretamente ao desenvolvimento embrionário (FURNUS et al., 2008; SILVA, et al., 2011).

A qualidade dos blastocistos produzidos está diretamente correlacionada à qualidade dos oócitos aspirados e à composição do meio de maturação, podendo ser afetada pelo sistema de cultivo *in vitro* (RIZOS et al., 2002; SANANMUANG et al., 2011). Desta forma, o uso de um antioxidante em concentração adequada pode contribuir para a geração de embriões de alta qualidade (KANG et al., 2016). Vale salientar que oócitos e embriões apresentam

diferentes necessidades quanto a quantidade de antioxidantes nos meios de cultivo (JANG et al., 2010).

Embriões cultivados *in vitro* apresentam qualidade fisiológica e morfológica inferior aos produzidos *in vivo* (POLISSENI et al., 2009). A biotécnica da PIVE submete os oócitos e embriões a condições ambientais de grande concentração de O₂ (20%), quando comparadas ao ambiente da tuba uterina (3 a 9%) (MASTROIANNI & JONES, 1965). Esta maior exposição ao O₂ faz com que haja uma maior produção de EROs que lesam as células, podendo ocasionar a perda de função (YANG et al., 1998; TAKAHASHI, 2012). Os radicais livres produzidos no sistema *in vitro* (superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxila) causam inativação enzimática, peroxidação lipídica da membrana celular e alterações no DNA (ANDRADE et al., 2010; SILVA et al., 2011). A adição de um agente antioxidante no meio de maturação da PIVE tem por finalidade reduzir os danos celulares advindos do estresse oxidativo, ocasionando uma melhoria nas taxas de desenvolvimento embrionário (GUEMRA et al., 2013). Quercetina e astaxantina já foram utilizadas na suplementação de meio de cultivo da PIVE e diminuíram os níveis de EROs no sistema *in vitro*, resultando na produção de blastocistos de melhor qualidade (GUEMRA et al., 2013; ISPADA et al., 2018)

Por outro lado, o processo de apoptose e morte celular é derivado de alterações ultra-estruturais frequentes como redistribuição de organelas na região cortical e agregação citoplasmática, vacuolização e rompimento da membrana e/ou matriz mitocondrial (LI et al., 2009). Independentemente do modelo experimental utilizado, a morte celular pode ou não ocorrer em função de efeitos extracelulares, podendo ser oriunda de efeitos fisiológicos intracelulares como estímulos, sinalização intercelular e regulação (LI et al., 2009). A coloração do TUNEL foi utilizada para visualização de sinais de apoptose nos blastocistos tratados com miricetina, sendo menor no grupo tratado em comparação ao grupo controle, demonstrando que os blastocistos tratados com miricetina apresentaram melhor qualidade no seu desenvolvimento embrionário.

Pesquisas recentes em diversas áreas de conhecimento, testaram a miricetina com o propósito de determinar sua maneira de atuação nos sistemas

in vivo e *in vitro*. Este antioxidante, apresenta dados controversos quanto a sua capacidade de ação quando utilizada *in vivo* ou *in vitro*, como propriedades anticarcinogênicas, pró-tumorigênica, antioxidantes, pró-oxidantes e ação fitoestrogênica (CHOBOT & HADACEK, 2011; SELLAPPAN & AKOH, 2002; MAGGIOLINI et al., 2005; AQUILA et al., 2013; YANG et al., 2017; RAHIMIFARD et al., 2017). Neste experimento, os resultados da miricetina comportaram-se similarmente aos da astaxantina (ISPADA et al., 2018), onde a menor concentração utilizada na suplementação do meio MIV não interfere negativamente na maturação oocitária e auxilia a produção de embriões com melhor qualidade, possivelmente devido a diminuição do estresse oxidativo no sistema *in vitro*. Desta forma, é necessário haver mais estudos sobre a miricetina na PIVE, a fim de aprofundar os conhecimentos sobre suas potencialidades.

5. CONCLUSÃO

A suplementação da maturação *in vitro* com antioxidante miricetina em dose de 10 μ M de miricetina interfere na taxa de maturação oocitária, já quanto a produção embrionária, o uso de 1 μ M de miricetina não interfere a taxa de produção de blastocistos e diminui o número de blastômeros apoptóticos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, E.R.; MELO-STERZA, F.A.; SENEDA, M.M.; ALFIERI, A.A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.34, n.2, p.79-85, abr./jun. 2010.

ANDRADE, R.G.; BOLFE, E.L.; BATISTELLA, M. Sustentabilidade da bovinocultura. **Revista Agroanalysis**, v. 35, n. 1, p. 29-31, 2015.

AQUILA, S.; SANTORO, M.; AMICIS, F. et al. Red wine consumption may affect sperm biology: the effects of different concentrations of the phytoestrogen myricetin on human male gamete function. **Mol. Reprod. Dev.**, v.80, p.155-165, 2013.

BATISTELLA, M.; BOLFE, E. L.; VICTORIA, D. C.; CUSTODIO, D. O.; SILVA, G. B. S.; DRUCKER, D. P. SOMABRASIL: **Sistema de Observação e Monitoramento da Agricultura no Brasil**. Campinas: Embrapa Monitoramento

por Satélite, 2012. 11 p. (Comunicado Técnico, 29). Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/939076/somabrasil-sistema-de-observacao-e-monitoramento-da-agriculturano-brasil>>. Acesso em: 23 set. 2017.

BEHLING, E.B.; SENDÃO, M.C.; FRANCESCATO, H.D.C. *et al.* Flavonoide Quercetina: Aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, v.15, p.285-292, 2004.

BONILLA, L. **Tutorial – Imagej**, 2008. 6 p. Disponível em: <http://animal.ifas.ufl.edu/hansen/lab_protocol_docs/tutorial_imagej_ticm.pdf> Acesso em: 20 jul. 2018.

CARNEIRO, G. F.; SILVA, S. V.; MEDEIROS, L. R. D.; GOMES NETO, O. C.; PROCÓPIO, O. C. S. Utilização Prática de Sêmen Congelado. In: **I Simpósio Brasileiro de Reprodução Assistida em Caprinos e Ovinos**, 2007, Gravata - PE. 2007.

CHOBOT, V.; HADACEK, F. Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin. **Redox. Rep.** v.16, p.242–247, 2011.

BOQUEST, A. C.; ABEYDEERA, L.R.; WANG, W. H.; DAY, B.N. Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 51, p.1311-1319, 1999.

FURNUS, C.; DE MATOS, D.G.; PICCO, S. *et al.* Metabolic requirements associated with GSH synthesis during in vitro maturation of cattle oocytes. **Anim. Reprod. Sci.**, v.109, p.88-99, 2008.

GALEATI, G.; VALLORANI, C.; BUCCI, D.; BERNARDINI, C; TAMANINI, C.; PARMEGGIANI, A.; SPINACI, M. Daidzein does affect progesterone secretion by pig cumulus cells but it does not impair oocytes IVM. **Theriogenology**, v. 74, p. 451–457, 2010.

GONÇALVES P.B.D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de embriões. In: GONÇALVES P.B.D., FIGUEIREDO J.R., FREITAS V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2002. p. 179-194.

GUEMRA, S.; MONZANI, P.S.; SANTOS, E.S.; ZANIN, R.; OHASHI, O.M.; MIRANDA, M.S.; ADONA P.S. Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios

suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.6, p.1616-1624, 2013.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa Pecuária Municipal**. 2016. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/cgi-bin>> Acesso em: 05 set. 2017.

HUANG, J.; HUANG, C.; FANG, J. et al. Protective effects of myricetin against ultraviolet- B-induced damage in human keratinocytes. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 21–28, 2010.

ISPADA, J.; RODRIGUES, T.A.; RISOLIA, P.H.B.; LIMA, R.S.; GONÇALVES, D.R.; RETTORI, D.; NICHI, M., FEITOSA, W.B.; PAULA-LOPES, F.F. Astaxanthin counteracts the effects of heat shock on the maturation of bovine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, 2018. <https://doi.org/10.1071/RD17271>.

JANG, H. Y.; JI, S. J.; KIM, Y. H.; LEE, H. Y.; SHIN, J. S.; CHEONG, H. T.; KIM, J. T.; PARK, I. C.; KONG, H. S.; PARK, C. K.; YANG, B. K. Antioxidative effects of astaxanthin against nitric oxide-induced oxidative stress on cell viability and gene expression in bovine oviduct epithelial cell and the developmental competence of bovine IVM/IVF embryos. **Reprod. Domest. Anim.**, v. 45, p. 967–974, 2010.

KANG, J.T.; KOO, O.J.; KWON, D.K.; PARK, H.J.; JANG, G.; KANG, S.K.; LEE, B.C. Effects of melatonin on in vitro maturation of porcine oocyte and expression of melatonin receptor RNA in cumulus and granulosa cells. **Journal of Pineal Research**, v.46, p.22– 28, 2009.

KANG, J.T.; KWON, D.K.; PARK, S.J.; KIM, S.J.; MOON, J.H.; KOO, O.J.; JANG, G.; LEE, B.C. Quercetin improves the in vitro development of porcine oocytes by decreasing reactive oxygen species levels. **Journal of Veterinary Science**, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2013.

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 Australas. J. Anim. Sci.**, v. 29, v. 3, p. 352-358, 2016.

LI, H.J.; LIU, D.J.; CANG, M. et al. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Animal Reproduction Science**, Hohhot, v. 114, n. 1-3, p. 89-98, 2009.

MAGGIOLINI, M.; RECCHIA, A.G.; BONOFILIO, D. et al. The red wine phenolics piceatannol and myricetin act as agonists for estrogen receptor α in human breast cancer cells. **Journal of Molecular Endocrinology**, v. 35, p. 269–281, 2005.

MÁXIMO, D.M. **Características ultraestruturais de ovócitos ovinos durante a maturação in vitro**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Animais) - Faculdade de agronomia e medicina veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.

MASTROIANNI L.; JONES, R. Oxygen tension within the rabbit fallopian tube. **J Reprod Fertil.**, v.9, p.:99-102, 1965.

NASCIMENTO, P.S.; CHAVES, M.S.; SANTOS FILHO, A.S.; GUIDO, S.I.; GUERRA, M.M.P.; BARTOLOMEU, C.C. Produção *in vitro* de embriões utilizando-se sêmen sexado de touros 5/8 girolando. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.3, p.358-368, jul./set, 2015.

PADILHA, L. C. **Santa inês submetidas a sucessivas sessões de aspiração folicular por videolaparoscopia**. 2012. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

POLISSENI, J.; SERAPIÃO, R.V.; CAMPOS JÚNIOR, P.H.A.; GRÁZIA, J.G.V.; MILEN, L.C.; CAMARGO, L.S.A; GUERRA, M.O.; PETERS, V.M.; Técnica de Tunel em embriões de Ratas Wistar: Avaliação da Qualidade e da Capacidade de Desenvolvimento dos Embriões. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 3, p. 110 - 113, 2009.

QIU, R.; WANG, J.; PARKIN, K.L. Activity-guided isolation of phase II enzyme inducers from buckwheat flour methanolic extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.9023>

RAHIMIFARD, M.; MAQBOOL, F.; MOEINI-NODEH, S.; NIAZ, K.; ABDOLLAHI, M.; BRAIDY, N.; NABAVI, S. F. Targeting the TLR4 signaling pathway by polyphenols: A novel therapeutic strategy for neuroinflammation. **Ageing Research Reviews**, v. 36, p. 11–19, 2017.

RIZOS, D.; WARD, F.; DUFFY, P.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. Consequences of bovine oocyte maturation, fertilization on early embryo development in vitro versus in vivo: implications for blastocyst yield and blastocyst quality. **Mol. Reprod. Dev.**, v.61, p.234–48, 2002.

SANANMUANG, T.; THARASANIT, T.; NGUYEN, C. et al. Culture medium and embryo density influence on developmental competence and gene expression of cat embryos **Theriogenology**. v.75, p.1708-1719, 2011.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C. Flavonoids and antioxidant capacity of Georgia-grown *Vidalia* onions. **J. Agric. Food. Chem.** v.50, p. 5338–5342, 2002.

SILVA, G.M.; ARAÚJO, V.R.; DUARTE A.B.G. et al. Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células ovarianas. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.35, p.315-326, 2011.

SOLAK, K.A.; SANTOS, R.R.; VAN DEN BERG, M., BLAAUBOER, B.J.; ROELEN, B.A.J.; VAN DUURSEN, M.B.M. Naringenin (NAR) and 8-prenylnaringenin (8-PN) reduce the developmental competence of porcine oocytes in vitro. **Reproductive Toxicology**, v. 49, p. 1–11, 2014.

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

YANG, C.; LIM, W.; BAZER, F.W.; SONG, G. Myricetin suppresses invasion and promotes cell death in human placental choriocarcinoma cells through induction of oxidative stress. **Cancer Letters**, v. 399, p. 10 – 19, 2017.

YANG, X.; KUBOTA, C; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.E; PRESICCE, G.A. Control of oocyte maturation in cows—biological factors. **Theriogenology**, v. 49, p. 471–82, 1998.

ZHENGQUANG, W.; CHUNQUAN, F.; SONGDONG, Y. Effect of supplementation of green tea polyphenols on the developmental competence of bovine oocytes in vitro. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.40, p. 1079-1085, 2007.