

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

**Efeito da adição de lectinas recombinantes de
Bauhinia forficata sobre o estresse oxidativo na
maturação *in vitro* de oócitos bovinos**

Morgana Alves Borges

Pelotas, 2020

Morgana Alves Borges

Efeito da adição de lectinas recombinantes de *Bauhinia forficata* sobre o estresse oxidativo na maturação *in vitro* de oócitos bovinos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Prof^o.Dr. Tiago Veiras Collares

Coorientador(es): Prof^a.Dr^a. Fabiana Seixas

Pelotas, 2020

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B732e Borges, Morgana Alves

Efeito da adição de lectinas recombinantes de *Bauhinia forficata* sobre o estresse oxidativo na maturação *in vitro* de oócitos bovinos / Morgana Alves Borges ; Tiago Veiras Collares, orientador ; Fabiana Seixas, coorientadora. — Pelotas, 2020.

74 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, 2020.

1. Toxicologia reprodutiva. 2. Screening. 3. Proteínas. 4. Oxido nítrico. I. Collares, Tiago Veiras, orient. II. Seixas, Fabiana, coorient. III. Título.

CDD : 636.2108926

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

BANCA EXAMINADORA

Profº. Dr. Vinícius Farias Campos (Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia)

Dr. Amilton Seixas (Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia)

Drª. Andrea Basso (Membro voluntário(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia)

Profº. Dr. Tiago Veiras Collares (Orientador, Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia)

Para meus pais, com carinho e gratidão.

Dedico.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida.

Aos meus pais, Helena e Mogar, por todo amor que me é dedicado e acima de tudo, por todo apoio e confiança na realização dos meus sonhos. Vocês são a razão pelo qual tenho forças para continuar, dedico esta conquista e meu amor eterno!

Ao meu amor, Wesley, pela paciência, carinho e amizade. Sou imensamente grata a Deus por ter você ao meu lado!

Aos meus avós, que de onde quer que vocês estejam, eu continuo lutando para dar orgulho a vocês! Foi uma honra vivenciar o amor que a mim foi concedido.

À minha afilhada, Mariana, que me incentiva a ser uma pessoa melhor todos os dias, agradeço pelos ensinamentos e pelo amor sincero, a dinda te ama muito.

Aos Mestres, que me concederam seus conhecimentos com amor durante toda a minha caminhada acadêmica, principalmente aos meus orientadores e amigos Prof^o. Dr. Tiago Collares, Prof^a Dr^a. Fabiana Seixas, Prof^o Dr. Luciano Pinto e a Prof^a. Dr^a Mariana Härter Remião, gratidão!

A todos do Laboratório de Biotecnologia do Câncer, especialmente a Fernanda Sabedra, Bruna Pacheco, Ana Laura feijó, Isadora Lopes, Júlia Damé e Daniel, pois me auxiliaram durante todo o projeto. Agradeço pela convivência e o aprendizado que obtive junto ao grupo.

À Universidade Federal de Pelotas pela infraestrutura, e a todos que contribuem de alguma forma para a formação de Mestres/Doutores do Curso de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec).

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Muito obrigada!

“Eu sou meu único obstáculo. Cada vez que me supero é a mim que venço. Não nasci para ser mais, melhor, menos, nem pior do que ninguém, mas para vencer meus limites. Não concorro em nada com ninguém. Eu sou o meu desafio!”

- Autor desconhecido

Resumo

BORGES, Morgana Alves. **Efeito da adição de lectinas recombinantes de *Bauhinia forficata* sobre o estresse oxidativo na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.** 2020. 77f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A semelhança em vários aspectos da foliculogênese com fêmeas monovulatórias torna a maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos uma ferramenta importante para o estudo da reprodução feminina. Esta biotecnologia reprodutiva é utilizada para a triagem de moléculas e serve como modelo para investigação toxicológica em processos reprodutivos para humanos. A lectina de *Bauhinia forficata* (nBfL) é uma proteína capaz de se ligar de forma reversível ao açúcar N-acetilgalactosamina, acrescentando-a inúmeras funções, e uma delas é a atividade antiproliferativa nas células tumorais. No entanto, seus efeitos ainda não foram avaliados em gametas femininos. O objetivo do presente estudo foi determinar o efeito da adição de lectinas recombinantes de *B. forficata* no meio de maturação *in vitro* de oócitos bovinos sobre a expressão de genes relacionados às vias de estresse oxidativo. Para obtenção das proteínas, o gene para lectina recombinante (rBfL) e sua isoforma truncada (rtBfL) foram clonados e expressos em *Escherichia coli* (*E. Coli*). Os oócitos obtidos por punção folicular foram incubados em meio IVM por 24 horas contendo concentrações de 10 µg / mL, 50 µg / mL e 100 µg / mL de nBfL, rBfL e rtBfL e um grupo não tratado como controle. Foram avaliadas a expansão das células *cumulus oophorus*, o estágio de maturação meiótica e os níveis de óxido nítrico (NO) no meio de maturação. Nos grupos tratados com a concentração de 100 µg / mL, foram avaliadas a expressão gênica dos genes envolvidos em vias de estresse oxidativo SOD2, CAT, GPX-1, GSR, NOS2 e apoptose BAX, CASP3. A expansão das células do *cumulus oophorus* de oócitos tratados, bem como a taxa de maturação nuclear, não foram estatisticamente diferentes do grupo controle, embora a proteína rBfL tenha aumentado os níveis de NO em todos os tratamentos em relação ao grupo controle. A proteína rtBfL aumentou a expressão dos genes SOD2, GSR e NOS2 e todas as lectinas testadas aumentaram a expressão do gene CASP3 em comparação ao grupo controle. Esses achados indicam que as concentrações testadas das lectinas recombinantes de *B. forficata* provavelmente influenciam na expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e aumentam a expressão do gene apoptótico CASP3 durante a maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

Palavras-chave: Toxicologia reprodutiva; Screening; Proteínas; Óxido Nítrico.

Abstract

BORGES, Morgana Alves. **Effect of the addition of *Bauhinia forficata* recombinant lectins on oxidative stress *in vitro* maturation of bovine oocytes.** 2020. 77f. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

The similarity in several aspects in folliculogenesis with monovulatory females makes *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes important tool for study to female reproductive. This reproductive biotechnology is widely used for screening of molecules and serves as a model for toxicological investigation in process reproductive for humans. The lectin of *Bauhinia forficata* (nBfL) is a protein able to bind reversibly to N-D-acetylgalactosamine, performing several functions and one of them is the antiproliferative activity in tumor cells, but its effects have not yet been evaluated in female gametes. The objective of the present study was to determine addition effect of *B. forficata* recombinants lectins in the medium of maturation *in vitro* of bovine oocytes in expression of genes related to oxidative stress pathways. To get the proteins, the gene for this recombinant lectin (rBfL) and its truncated isoform (rtBfL) were cloned and expressed in *Escherichia coli* (*E. Coli*). The oocytes obtained through follicular puncture were incubated in IVM medium for 24 hours containing concentrations of 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL of nBfL, rBfL and rtBfL, and a no treated group as a control. The expansion of the *cumulus oophorus* cells, the meiotic maturation stage, the nitric oxide (NO) levels in the maturation medium were evaluated. In the groups treated with the concentration of 100 µg / mL, the gene expression of genes involved in oxidative stress SOD2, CAT, GPX-1, GSR, NOS2 and apoptosis BAX, CASP3 were evaluated. The expansion of the *cumulus oophorus* cells of treated oocytes, as well as the nuclear maturation rate, was not statistically different from the control group, though rBfL increased NO levels in all treatments in relation to the control group. The rtBfL increased the expression of the SOD2, GSR and NOS2 genes and all the tested lectins increased the expression of the CASP3 gene compared to the control group. These findings indicate that the tested concentrations of the *B. forficata* recombinants lectins probably influence on expression of oxidative stress genes and increase the expression of the apoptotic gene CASP3 during *in vitro* maturation of bovine oocytes.

Keywords: *Reproductive toxicology; Screening; Proteins; Nitric Oxide.*

Lista de Figuras

Figura 1. Expansão das células do <i>cumulus</i>	17
Figura 2. Primeira linha de defesa antioxidante intracelular..	25
Figura 3. Retomada da meiose: NO como sinalizador.....	28

Lista de Abreviaturas

°C	Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitro
µM	Micromolar
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensageiro
CAT	Catalase
CCOs	Complexo <i>Cumulus oophorus</i>
CDK1	Quinase dependentes de ciclina
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
cNOS	Óxido nítrico sintase constitutivas
CO ₂	Dióxido de carbono
CSF	Fator citosólico
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
g	Gramas
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GDF-9	Fator de diferenciação do crescimento 9
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPXs	Glutathione peroxidases
GSH	Glutathione
GSR	Glutathione redutase
GSSG	Glutathione dissulfeto
GTP	Trifosfato de guanosina
GVBD	Degradação de vesículas germinativas
iNOS	Independente de cálcio
LH	Hormônio luteinizante
MI	Metáfase I

MII	Metáfase II
miRNA	MicroRNA
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MPF	Fator promotor da maturação
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
nBf	<i>Bauhinia forficata</i> nativa
nm	Nanômetro
nNOS	Óxido nítrico sintase neural
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂	Oxigênio
PBS	Phosphate buffer saline
PDE3A	Fosfodiesterase 3
pH	Potencial Hidrogeniônico
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKA	Proteína quinase A
PVP	Polivinilpirrolidona
rBf	<i>Bauhinia forficata</i> recombinante
rtBf	<i>Bauhinia forficata</i> recombinante truncada
SOD	Superóxido dismutase
TZP	Projeções transzonais
UV	Ultravioleta
VG	Vesícula germinativa

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1 Oogenese e Maturação oocitária.....	16
2.1.1 Maturação citoplasmática e nuclear.....	18
2.2 Intercomunicação <i>Cumulus</i> -oocito.....	21
2.3 Estresse Oxidativo.....	23
2.4 Atividade do Oxido Nitrico na maturação oocitária.....	26
2.5 Principio dos 3Rs e <i>screening</i> toxicológico de moléculas.....	28
2.6 Lectinas.....	29
2.6.1 Lectina <i>Bauhinia forficata</i>	31
3 HIPÓTESE E OBJETIVOS	34
3.1 Hipótese	34
3.2 Objetivo Geral.....	34
3.3 Objetivos Específicos.....	34
4 MANUSCRITO – Effect of the addition of <i>Bauhinia forficata</i> recombinant lectins on oxidative stress <i>in vitro</i> maturation of bovine oocytes.....	35
5 CONCLUSÃO GERAL	62
6 REFERÊNCIA.....	63

1 INTRODUÇÃO GERAL

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma importante plataforma para investigação de toxicidade em processos relacionados a reprodução, sendo essencial para o desenvolvimento de metodologias de triagem de novas moléculas com potencial biológico ou efeito citotóxico (GENSCHOW et al., 2002; BEKER VAN WOUDEMBERG et al., 2012). A Maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos é uma etapa primordial da PIVE, contribuindo para a elucidação de eventos reprodutivos devido à semelhança, em vários aspectos fisiológicos, a outras fêmeas monovulatórias (CAMPBELL et al., 2003; VAN WOUDEMBERG et al., 2012). Desta forma, tanto a PIVE quanto a MIV de oócitos bovinos são metodologias utilizadas para investigar sistemas de entrega de fármacos e novos compostos sintéticos que possam apresentar um potencial risco toxicológico ao processo reprodutivo (VAN WOUDEMBERG et al., 2012; KOMNINOU et al., 2016; REMIÃO et al., 2016; LUCAS et al., 2017).

No entanto, é de suma importância aprimorar os sistemas de *screening* de moléculas com atividades desconhecidas para que seja efetivamente implementado o princípio dos 3Rs (VAN WOUDEMBERG et al., 2012). Descrito pela primeira vez por RUSSELL e BURCH (1959) o conceito dos 3Rs: *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*, visa utilizar metodologias mais racionais para substituir o uso de animais vivos em experimentos. Para isto, desenvolver ferramentas que auxiliem neste processo é fundamental, logo, os estudos que utilizam ensaios de toxicidade *in vitro* demonstraram um crescimento exponencial, uma vez que os mesmos reduzem a quantidade de compostos manipulados e aumentam a qualidade e a reprodutibilidade dos dados relatados (BLOMME; WILL, 2016). Ademais, inúmeros estudos em mamíferos (classe comumente utilizada como biomodelo) avaliaram o efeito da suplementação aos meios de MIV com incontáveis compostos, dentre eles se destacam os que interagem com vias de estresse oxidativo, ou seja, moléculas que possuem atividade antioxidante (DELEUZE; GOUDET 2010; KHAZAEI; AGHAZ, 2017).

Sendo assim, novas moléculas são constantemente investigadas quanto às suas propriedades e função, logo, as lectinas despertam grande interesse. Os pioneiros que investigaram as características das lectinas foram Peumans e Van Damme (1995), classificando-as como proteínas que se ligam reversivelmente a um

mono ou oligossacarídeo de forma altamente específica e que dispõem de, ao menos, um domínio não catalítico de origem não imunogênica. Desde então, muitas funções são descritas na literatura, algumas lectinas estimulam a proliferação celular (CARVALHO et al., 2018) e cicatrização de tecidos (GONZAGA DO NASCIMENTO-NETO et al., 2012), outras demonstram atividade antioxidante (E LACERDA et al., 2017), há também relatos de lectinas que interagem em vias apoptóticas e antitumorais (LIU et al., 2012). Todavia, a expressão de proteínas em sua forma nativa é relativamente baixa, uma alternativa promissora a esta problemática é a sua produção em larga escala utilizando um sistema heterólogo de expressão (KLAFKE et al., 2016). A tecnologia do DNA recombinante é uma metodologia comumente empregada na clonagem e expressão de proteínas em organismos heterólogos (STREICHER; SHARON, 2003; OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2013), havendo inúmeras vantagens na utilização desta ferramenta para a produção e purificação de proteínas recombinantes, uma delas é a alta eficiência na quantidade de proteína expressa (OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2013).

As lectinas de *Bauhinia forficata* obtidas de forma recombinante apresentam características estruturais semelhantes às nativas extraídas das plantas (PINTO et al., 2019). Contudo, torna-se necessário compreender as suas modificações, interações (proteína-carboidrato) e atividade estrutural em relação aos gliconjugados em processos fisiológicos (SHANMUGHAM et al., 2006), bem como, investigar sua atividade e influência na sinalização de sistemas de oxiredução. Um importante sinalizador deste sistema de redução é o óxido nítrico (NO), o qual é produzido endogenamente na célula e atua em inúmeros processos vitais intra e extracelulares, principalmente na transdução de sinais (GUTTERIDGE, 1994; HANAFY; KRUMENACKER; MURAD, 2001). Em mamíferos, o NO quando modulado pela expressão gênica é fundamental nos eventos relacionados à reprodução (HEFLER; GREGG, 2002). Na espécie bovina, baixas concentrações de NO demonstram estimular os processos meióticos e consequentemente a maturação de oócitos durante a MIV, enquanto que altos níveis geram um efeito inibitório bloqueando o progresso da metáfase (BILODEAU-GOESEELS, 2007).

A análise da toxicidade dos níveis de NO na MIV frente ao *screening* de novas moléculas é essencial para entendermos os mecanismos regulatórios do processo de maturação oocitária *in vitro*. Portanto, a avaliação toxicológica *in vitro* se faz de suma

importância para identificar possíveis modulações farmacológicas da atividade destas moléculas, além de delinear os efeitos tóxicos e benéficos (BLOMME; WILL, 2015). Neste sentido, o objeto deste trabalho foi avaliar a atividade de lectinas de *Bauhinia forficata* expressas por *Escherichia coli* (*E.Coli*), suplementando em diferentes concentrações o meio de MIV e analisando parâmetros como a taxa de maturação de oócitos, a expansão das células do *cumulus*, a quantificação dos níveis de óxido nítrico (NO) e a expressão de genes relacionados à apoptose e às vias do estresse oxidativo em oócitos bovinos maturados *in vitro*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Foliculogênese e oogênese

Durante o desenvolvimento fetal de mamíferos é possível observar um processo chamado oogênese que da origem às células germinativas femininas diferenciadas denominadas oócitos (MARION et al 1971; HIRSHFIELD, 1991). Os oócitos iniciam o progresso da meiose ainda durante a vida fetal, mas a acabam interrompendo em estágio de diplóteno da prófase I, a chamada vesícula germinativa, até que sejam novamente estimulados para se desenvolver à fase de pré-ovulação (FORTUNE et al., 1994). Este evento ocorre simultaneamente ao processo de foliculogênese, onde há a formação, crescimento e maturação folicular, dando origem aos folículos primordiais e finalizando com os folículos em estágio pré-ovulatório (FOOTE et al 1975; SAUMANDE, 1981). Nesta etapa, os hormônios gonadotróficos são responsáveis por regular estas fases, e a ação do hormônio folículo estimulante (FSH), em seus respectivos receptores, ativa uma cascata de sinalização nas células da granulosa, levando à maturação dos folículos de Graaf (KUMAR et al., 1997; DIERICH et al., 1998; FOWLER et al., 2003).

As células da granulosa são primordiais para iniciar o processo de ovulação, aquelas que permanecem no folículo ovulado em conjunto com as células da teca constituirão uma estrutura denominada corpo lúteo, inicialmente responsável pela secreção de progesterona, hormônio fundamental para a manutenção da gestação (EPPIG, 2001). O processo de expansão das células do *cumulus*, também é necessário para que ocorra a ovulação (CHEN; RUSSELL; LARSEN, 1993). Uma vez que os oócitos retomam a meiose em resposta aos hormônios gonadotróficos se tornando maduros, as células do *cumulus* secretam ácido hialurônico que, quando hidratado, preenche os espaços entre as células, ampliando-as em uma matriz mucificada (Figura 1) (EPPIG, 1979; SALUSTRI; YANAGISHITA; HASCALL, 1989; CHEN et al., 1996).

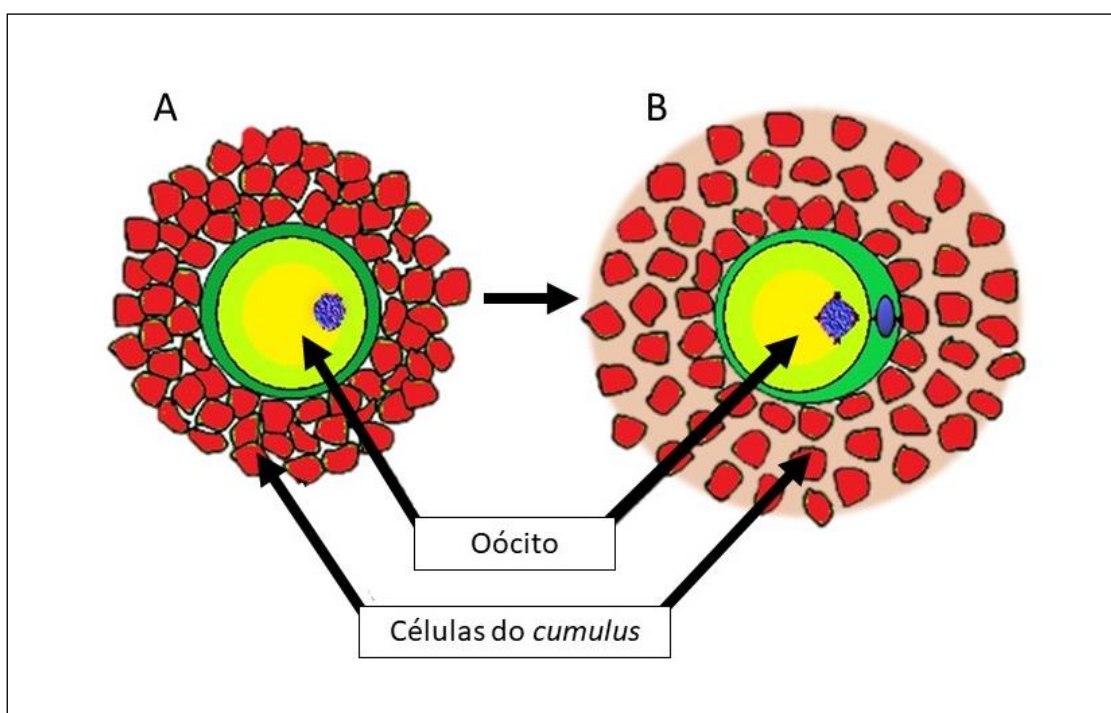


Figura 1. Expansão das células do *cumulus*. Oócito imaturo (A); Oócito maduro com as células do *cumulus* expandidas por processo de mucificação da matriz das células do *cumulus* (B). Fonte: Adaptado de SUTTON-MCDOWALL; GILCHRIST; THOMPSON (2010).

A competência oocitária é crucial para o sucesso da fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário, para tal, é necessário que ocorra a maturação oocitária, evento fisiológico precedente à ovulação e dependente de modificações moleculares e hormonais às quais estas células estão expostas, principalmente as que se encontram em estágio ovulatório progressivo (LONERGAN; FAIR, 2016). Desta forma, *in vivo*, o oócito maduro presente no folículo pré-ovulatório é estimulado à ovulação através da elevação dos níveis de hormônio luteinizante (LH) e, por conseguinte, com a retomada da meiose, inicia-se a extrusão do primeiro corpúsculo polar (RICHARD; SIRARD, 1996). No entanto, os oócitos que são maturados *in vitro* obtidos a partir de folículos os quais não foram estimulados pela ação do LH, retomam a meiose assim que são removidos do folículo (PINCUS; ENZMANN, 1935). Os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) devem ser mantidos em condições apropriadas para a finalização de todo o processo de competência oocitária, uma vez que, após a remoção de seu microambiente folicular, a retomada da meiose não é mais bloqueada pelos fatores inibitórios da maturação ocorridos *in vivo* (SIRARD et al 1998). Além disso, o aporte nutritivo para o posterior desenvolvimento embrionário é ofertado pelo o oócito. Seu material genético, transcritos e proteínas citoplasmáticas são indispensáveis para o desenvolvimento inicial do embrião, auxiliando na ativação do seu próprio genoma e

refletindo na qualidade embrionária (SCHULTZ, 2002; CAMARGO et al 2006). Portanto, o microambiente folicular é essencial para a reativação meiótica, bem como para auxiliar na manutenção do oócito quando o mesmo se encontra em estágio de vesícula germinativa.

2.1.1 Maturação citoplasmática e nuclear do oócito

Anteriormente ao sinal de ovulação o oócito readequa sua estrutura funcional intracitoplasmática e, concomitante à ação do LH nas células da granulosa, há uma alteração na sinalização endocelular a qual induz à retomada meiótica (MEHLMANN, 2005). Estas modificações consequentes da progressão celular para metáfase, fazem com que o oócito amplifique as suas principais organelas como, por exemplo, as mitocôndrias e os grânulos corticais (ASSEY et al., 1994). Estes últimos, são um mecanismo crucial para a prevenção da polispermia na maioria das espécies em resposta à penetração do espermatozoide no oolema (SUN 2003; HALEY; WESSEL, 2004). Os grânulos corticais liberam enzimas e glicoproteínas específicas neles incluídas e a exocitose destas moléculas é chamada de reação cortical, a qual promove alterações na matriz extracelular do oócito (MYLES, 1995). Este evento ocasiona a inativação de receptores de espermatozoide na zona pelúcida com subsequente endurecimento da mesma, processo denominado de reação de zona, evitando, assim, a penetração de outro espermatozoide (MYLES, 1995; DE CARVALHO, 2002).

No decorrer do processo de maturação citoplasmática são acumuladas moléculas essenciais para tornar o oócito apto a ser fertilizado como, por exemplo, lipídios, aminoácidos, glutatona e glicose (SUTTON et al., 2003; FERREIRA et al., 2009; SUTTON-MCDOWALL et al., 2010). As moléculas acumuladas durante o processo de maturação citoplasmática são indispensáveis e promovem o aporte nutritivo necessário aos eventos pós-fertilização. Além disso, também são armazenados transcritos e proteínas no citoplasma do oócito, garantindo a progressão inicial do embrião até que seu genoma seja ativado e ocorra a síntese de novas proteínas (FERREIRA, et al., 2009). Em bovinos, esta transcrição inicial se dá no estágio de oito células e é dependente de alguns fatores maternos de transcrição armazenados no oócito (VIGNEAULT et al., 2004).

Durante a maturação citoplasmática, a maquinaria de transcrição e tradução é modificada após os transcritos de interesse serem condicionados e, assim, o oócito conclui a preparação inicial e a síntese de proteínas e ácidos ribonucleicos (RNAs), relevantes para a progressão do presumível embrião (HYTTEL et al., 1986; HYTTEL et al., 1988; FAIR et al., 1995). Ainda, a qualidade e a taxa de desenvolvimento embrionário estão intimamente relacionadas às condições citoplasmáticas herdadas podendo estar, até mesmo, correlacionadas a uma transcrição materno zigótica efetivamente mais funcional (MEIRELLES, et al., 2004). Em síntese, a maturação citoplasmática pode ser subdividida em três principais eventos: remanejamento das organelas citoplasmáticas, atividade dos filamentos do citoesqueleto e maturação molecular (FERREIRA et al., 2009).

A capacidade do oócito em se tornar competente é proveniente de inúmeras modificações bioquímicas, estruturais citoplasmáticas e nucleares, resultantes do processo de maturação e cruciais para fornecer suporte ao embrião em seu estágio inicial (BALL et al 1984; ASSEY et al 1994; HYTTEL et al 1997). Desta forma, a competência meiótica é obtida no período de formação do antro folicular antes do aumento do hormônio LH, por isso o microambiente para todo este processo e a concentração de metabolitos acumulados são de extrema importância para proporcionar de forma adequada as cascatas moleculares e a posterior ativação do genoma embrionário (ERICKSON; SORENSEN, 1974; SORENSEN; WASSARMAN, 1976; MEHLMANN et al., 2004; SIRARD et al., 2006). No instante em que o oócito adquire um nível incipiente de proteínas como a quinase dependente de ciclina (CDK1) e a ciclina, inicia-se a progressão do ciclo celular (DE VANTÉRY et al., 1996, 1997; KANATSU-SHINOHARA et al., 2000). Porém, a excedente atividade de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) mantém a parada meiótica reprimindo a ação de fatores promotores da maturação, por estimular a proteína quinase A (PKA) dependente de AMPc (NORRIS et al., 2009; VACCARI et al., 2009). Previamente ao aumento de LH, as células da granulosa liberam guanosina monofosfato cíclico (GMPc) por meio de junções Gap, que inibe a atividade da fosfodiesterase 3 (PDE3A) no oócito, desta forma, o oócito permanece recluso em diplóteno da prófase I até o aumento dos níveis de LH (MEHLMANN, 2005; VACCARI et al., 2009; NORRIS et al., 2009).

A partir do momento em que há o aumento de LH, o oócito é estimulado a retomar a meiose pelo fator promotor da maturação (MPF) (SUGIURA et al., 2006) e, posteriormente, os eventos nucleares começam a ser observados como, por exemplo, a degradação da vesícula germinativa (GVBD), a condensação da cromatina e a dissipação do núcleo e do envoltório nuclear (KUBELKA et al., 1988). Consequentemente, completa-se a progressão ao estágio de Metáfase I (MI), no qual os cromossomos homólogos se alinham e formam a placa equatorial. Logo em seguida, no estágio de Anáfase I as cromátides irmãs são separadas e ocorre a divisão longitudinal dos centrômeros, finalizando no estágio de Telófase I em que é possível observar a descondesação parcial das cromátides e a organização da carioteca (MAYES; SIRARD, 2001; JONES, 2004).

Após a primeira Metáfase, o oócito pára novamente em Metafase II (MII) quando há a extrusão do primeiro corpúsculo polar, e será novamente ativado apenas no decorrer da fertilização, pois a progressão do ciclo celular é bloqueada pelo o fator citoplasmático citostático (CSF) (SIRARD et al., 1989; MAYES; SIRARD, 2001; SIRARD et al., 2006). Agora, a reativação do ciclo celular acontece quando há um aumento de cálcio iniciado pela fusão do espermatozoide no processo de fertilização, por meio de uma cascata de sinalização intracelular (MASUI, 2000). Consequentemente, a partir da degradação do CSF são retomadas as divisões celulares e, por fim, é ativada a formação do pronúcleo (MIYAZAKI; ITO, 2006). A fase de transcrição celular é um momento crucial para o desenvolvimento embrionário, e diversos fatores podem interferir neste processo, resultando no bloqueio do ciclo celular (MEMILI; FIRST, 2000). A transcrição materno zigótica está intimamente relacionada com as possíveis interrupções no ciclo celular, uma vez que foram disponibilizados pelo oócito as proteínas e os ácidos ribonucleicos mensageiros (RNAm) necessários para que o embrião prossiga seu desenvolvimento de forma adequada até que sua maquinaria de transcrição esteja ativada (DE SOUSA et al., 1998). Ainda, o sucesso da MIV está relacionado à comunicação entre o oócito e as células do cumulus, fatores de regulação e moléculas transportadas também são responsáveis pela qualidade oocitária (TANGHE et al., 2002; KHAZAEI; AGHAZ, 2017). Desta forma, ao entendermos como estes eventos moleculares relacionados à comunicação cumulus-oócito interferem fisiologicamente na estrutura do gameta, poderemos manipular a fertilidade (CONTI et al., 2002).

2.2 Intercomunicação *cumulus*-oócito

Apesar dos avanços tecnológicos, um dos limitantes da PIVE de bovinos é a qualidade oócitaria, uma vez que a taxa de blastocistos atinge aproximadamente 35 a 40% dos oócitos obtidos após a recuperação *post-mortem*, ou seja, de ovários provenientes de abatedouros (BRACKETT; ZUELKE, 1993; MAYES; SIRARD, 2001). A morfologia dos CCOs está estreitamente relacionada com a competência oócitaria e com o posterior desenvolvimento embrionário, portanto, a seleção e a avaliação destas estruturas se tornam um processo fundamental na PIVE (HAZELEGER; STUBBINGS, 1992; HAWK; WALL, 1994; AM DE LOOS et al., 1994). Diversas metodologias de avaliação foram empregadas para selecionar os CCOs a fim de aumentar a produção de blastocistos (MAYES; SIRARD, 2001). Os CCOs passaram a ser avaliados por sua morfologia, onde a presença de grânulos citoplasmáticos ou indícios de atresia os tornam incompetentes e, conseqüentemente, levam-nos ao descarte. Por outro lado, aqueles que possuem o citoplasma homogêneo e mais de três camadas de células do *cumulus* compactas são avaliados como aptos a prosseguir à etapa de fertilização e subsequente desenvolvimento embrionário (BLONDIN; SIRARD, 1995; MAYES; SIRARD, 2001).

Para que haja progresso dos oócitos em estágios iniciais do período intrafolicular e subsequente sucesso na MIV, é essencial que a doadora receba tratamento adequado anteriormente a aspiração folicular *in vivo* (BLONDIN; SIRARD, 1997). Esta característica é comprovada através de estudos que correlacionaram a competência e a qualidade morfológica do oócito com o folículo de origem na espécie bovina (BLONDIN; SIRARD, 1995; HAGEMANN, 1999; SUTTON et al., 2003). Ademais, é crucial que a intercomunicação entre a célula germinativa e os compartimentos somáticos foliculares ocorra de forma adequada por meio de junções gap e de sinalização parácrina (SUTTON et al., 2003), essenciais para a oogenese e foliculogenese (DONG et al., 1996; GALLOWAY et al., 2000).

A comunicação ocorre de forma bidirecional, ou seja, as células da granulosa contribuem dando suporte ao desenvolvimento do oócito, do mesmo modo que o oócito também envia sinais parácrinos às células da granulosa, os quais atuam como reguladores, influenciando também nas funções ovarianas (ALBERTINI et al., 2001; EPPIG, 2001). Além disso, alguns fatores secretados por oócitos no desenvolvimento folicular tardio são fundamentais para as células da granulosa como, por exemplo, o

fator de diferenciação do crescimento 9 (GDF-9), que atua na diferenciação e regulação destas células (EPPIG et al., 1997; LI et al., 2000; SUTTON et al., 2003). Outro canal de comunicação muito importante que ocorre entre o oócito e as células do *cumulus* são as projeções transzonais (TZP), estas projeções conseguem penetrar através da zona pelúcida e ir em direção ao oolema, as TZPs permitem o transporte de moléculas de baixo peso molecular por conter em suas extremidades junções de lacunas, estas conexões ocorrem também entre as células do *cumulus* (EPPIG, 1991).

Além disso, as junções comunicantes ou junções gap, são extremamente importantes para o desenvolvimento oocitário, visto que este contato entre as células do *cumulus* e o oócito é vital para a disseminação de sinais e também para a sinalização endócrina local (SUTTON et al., 2003). Estas junções participam da regulação meiótica oocitária, viabilizando a passagem de moléculas reguladoras que atuam intracelularmente como as purinas e o cAMP (DEKEL; BEERS, 1980; SALUSTRI; SIRACUSA, 1983; EPPIG; DOWNS, 1984; RACOWSKY, 1985; RACOWSKY; SATTERLIE, 1985). Ainda, moléculas como aminoácidos, nucleotídeos e metabolitos da glicose podem transitar através destas junções (SUTTON et al., 2003).

É importante o conhecimento destes elementos substanciais, metabólicos ou hormonais, bem como o papel dos mesmos no desenvolvimento e competência oocitária (COLONNA; MANGIA, 1983; ZUELKE; BRACKETT, 1993; KHURANA; NIEMANN, 2000). Além disso, a maturação oocitária possui um padrão de expressão gênica intrínseco, que pode sofrer alterações transitórias mas que direciona o desenvolvimento do oócito conforme a fase do ciclo celular, embora a transcrição nos oócitos no estágio de GVBD esteja relativamente estagnada (SONG; WESSEL, 2005; FAIR et al., 2007; GILCHRIST et al., 2016). Em síntese, inúmeros genes que integram o painel de sinalização e influenciam o ciclo celular passam por variações na sua expressão durante a progressão dos estágios de maturação (GILCHRIST et al., 2016), estas alterações podem estar relacionadas à regulação dos níveis de transcritos por intermédio de microRNAs (miRNAs) (TANG et al., 2007; TESFAYE et al., 2009). Deste modo, a regulação molecular desempenhada pelos miRNAs de fato é relevante durante todo o processo de maturação e subsequente desenvolvimento embrionário inicial, dado que é neste período que ocorrem diversos eventos de sinalização

regulatórios, progressão do ciclo celular, apoptose e proliferação celular (GILCHRIST et al., 2016).

2.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a remoção das mesmas pelo sistema de defesa antioxidante que tem a função de reparar ou inibir os danos causados pelos radicais livres (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Radicais livres foram descritos como qualquer molécula ou átomo que possua um ou mais elétrons não emparelhados na última camada eletrônica e que, de forma molecular, tornam-se altamente reativos causando danos celulares pela oxidação excessiva (GUTTERIDGE, 1994; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). O óxido nítrico e o dióxido de nitrogênio (NO_2) são exemplos de radicais livres, porém, o NO produzido endogenamente na célula atua em inúmeros processos celulares vitais, principalmente na transdução de sinais (GUTTERIDGE, 1994; HANAFY; KRUMENACKER; MURAD, 2001). Assim como em condições aeróbicas, o oxigênio é uma molécula essencial para a viabilidade celular, entretanto, alguns de seus produtos metabólicos de redução, as EROs, podem modificar as funções celulares ocasionando danos irreversíveis e direcionando a célula aos processos apoptóticos (DE LAMIRANDE; GAGNON, 1995).

As EROs se movimentam através das membranas celulares modificando moléculas fundamentais para a manutenção de funções biológicas, como os ácidos nucleicos, lipídios e proteínas (PIERCE; CACKLER; ARNETT, 2004). Estudos demonstram que, na fisiologia oocitária, as EROs são apontadas como sinalizadores moleculares que desestabilizam o MPF pela diminuição do potencial de membrana mitocondrial (MMP) ativando espontaneamente os oócitos em MII sem haver fecundação (KEEFER; SCHUETZ, 1982; PREMKUMAR; CHAUBE, 2016). Este influxo acarreta importantes alterações mitocondriais (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999), bem como interrupção do desenvolvimento embrionário e morte celular (HASHIMOTO et al., 2000). Pode, ainda, promover uma variação nos padrões de expressão gênica, ocasionando danos à membrana celular e ao DNA no decorrer de um processo chamado peroxidação lipídica (GONÇALVES, 2010). As EROs exercem grande influência na fertilidade masculina, pois impede a interação do espermatozoide com o oócito (AITKEN, 1987).

O processo de maturação oocitária *in vivo* também sofre grandes instabilidades com o estresse oxidativo, desta forma, é importante que as defesas antioxidantes endógenas e exógenas se mantenham estáveis para que ocorra a fertilização de forma apropriada (B. MAILHES et al., 2000). Já na MIV, constata-se que os níveis de EROs é consideravelmente superior, pois além de haver metabolitos de substratos que não são encontrados no trato reprodutivo da fêmea *in vivo*, há demasiada manipulação, exposição à luz e à altas concentrações de oxigênio (GUERIN et al., 2001; AGARWAL et al., 2006). Inúmeros estudos avaliaram o efeito da suplementação aos meios de MIV com compostos antioxidantes, principalmente em mamíferos, os quais comumente são utilizados como biomodelos (DELEUZE; GOUDET 2010; KHAZAEI; AGHAZ, 2017). E para que a viabilidade celular seja mantida, as reações de oxidação-redução, denominadas reações redox, estão envolvidas em diversos processos fundamentais para o equilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes (BURTON; JAUNIAUX, 2011; SIES, 2015).

Os agentes antioxidantes são substâncias capazes de inibir ou atrasar a oxidação de um substrato, mesmo que em baixas concentrações, quando comparados à concentração da molécula oxidável (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Estes compostos impedem a formação de radicais livres e são classificados como: Enzimáticos e não enzimáticos (SIES, 1997). As defesas antioxidantes enzimáticas, fisiologicamente possuem competência para neutralizar as EROs em excesso e, conseqüentemente, impedir possíveis danos à estrutura celular e molecular (KHAZAEI; AGHAZ, 2017), inclusos neste grupo estão os compostos de superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPXs), inúmeras peroxidases e peroxiredoxinas (PRDXs) (AGARWAL; GUPTA; SHARMA, 2005). A SOD, CAT e GPX são as principais enzimas que atuam na primeira linha de defesa antioxidante intracelular (IGHODARO.; AKINLOYE, 2018).

A primeira enzima endógena antioxidante de desintoxicação é a SOD, ela catalisa a dismutação de ânion de superóxido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio molecular (O_2), diminuindo o potencial dano causado à célula (FRIDOVICH, 1995). Em seguida a CAT, que está presente na maioria dos tecidos vivos dependentes de oxigênio, localizada intracelularmente nos peroxissomos, é responsável por complementar o processo iniciado pela SOD, catalisando a degradação ou redução de H_2O_2 a água e oxigénio molecular utilizando elementos metálicos (ferro ou manganês) como cofator (CHELIKANI; FITA; LOEWEN, 2004). Por último as GPXs, enzimas intracelulares são encontradas no citosol, e especialmente nas mitocôndrias, estas enzimas catalisam o H_2O_2 a água e O_2 (WENDEL, 1981; URSINI; MAIORINO; GREGOLIN, 1985). A sua principal atividade é dependente da enzima glutiona redutase (GSR), a qual reduz a glutatona dissulfeto (GSSG) em sua forma sulfidril reduzida (GSH) com gasto de energia pela oxidação do NADPH (Figura 2) (WENDEL, 1981).

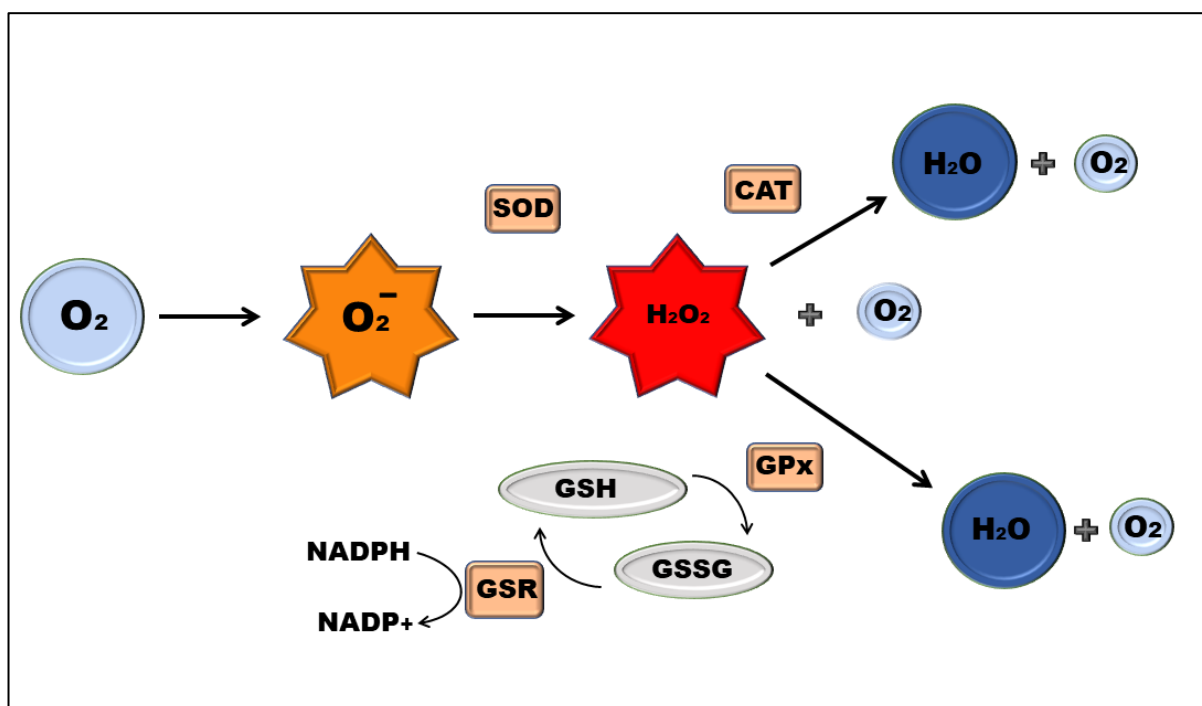


Figura 2. Primeira linha de defesa antioxidante intracelular. O oxigênio molecular ganha um elétron e se torna um ânion superóxido. A SOD catalisa a dismutação de ânion de superóxido em peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e oxigénio molecular (O_2). A CAT, catalisa a degradação ou redução de H_2O_2 a água (H_2O) e O_2 . A GPX é dependente da enzima GSR, a qual reduz a GSSG em GSH com gasto de energia pela oxidação do NADPH. Fonte: Adaptado de WENDEL (1981).

Além disto, os antioxidantes possuem atividade redutora ao grupo peróxido de vários hidroperóxidos lipídicos e sintéticos, obtendo o álcool como produto e

desempenhando um papel importante na proteção contra o processo de peroxidação lipídica causado pelo estresse oxidativo (WENDEL, 1981; IMAI; NAKAGAWA, 2003). Da mesma maneira, os compostos antioxidantes não enzimáticos contribuem de forma significativa à redução dos níveis de EROs, dentre eles estão a glutatona, vitamina C (ascorbato), vitamina A, taurina, piruvato, zinco, selênio, beta-caroteno e caroteno (SIKKA, 2004; KHAZAEI; AGHAZ, 2017).

2.4 Atividade do Óxido Nítrico na maturação oocitária

Descrito pela primeira vez como um gás por Joseph Priestly et al. (1772), o NO despertou grande interesse na investigação de sua atividade endógena na fisiologia celular (MONCADA; HIGGS, 1991; GUTTERIDGE, 1994). Em mamíferos, a sua síntese se dá através da enzima NO sintase (NOS), a qual catalisa o aminoácido L-arginina e, além de produzir NO, o aminoácido L-citrulina também é produto desta reação (BUSH et al., 1992). Para tal, a NOS necessita de dois cofatores primordiais: O_2 e Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato (NADPH) (MARLETTA, 1993). São descritas três isoformas de NOS, das quais duas são dependentes de cálcio e sintetizam NO em condições basais, por isso denominadas constitutivas (cNOS), que são a endotelial (eNOS) e a neural (nNOS) (SENGOKU et al., 2001). Já a isoforma induzível, ou seja, independente de cálcio (iNOS), expressa NO em grandes quantidades somente quando o sistema imune é estimulado (LOWENSTEIN; DINERMAN; SNYDER, 1994; SENGOKU et al., 2001).

O NO é um importante sinalizador intracelular, inúmeros estudos demonstram que sua ação induz a enzima guanilato ciclase a produzir GMPc que atua como segundo mensageiro e após a descoberta desta importante via de sinalização, foi possível compreender os mecanismos de transdução de sinal e comunicação extracelular/intracelular (MURAD, 1994). Sabe-se que o NO é uma molécula relativamente simples, mas possui inúmeras funções biológicas, sendo um importante neurotransmissor no mecanismo de broncodilatação neural (BELVISI et al., 1992), além disso é responsável pelo relaxamento do músculo liso (BOLOTINA et al., 1994), pelo estímulo vasodilatação (JOANNIDES et al. 1995), e sintetizado em altos níveis por muitas células do sistema imunológico durante processos inflamatórios (COLEMAN, 2001).

Em mamíferos, o NO exerce funções fundamentais nos eventos relacionados à reprodução, principalmente quando modulado pela expressão gênica (HEFLER; GREGG, 2002). Além disto, estudos em murinos demonstraram que o NO está relacionado ao processo de maturação oocitária *in vitro*, havendo uma via pela qual seus níveis intracelulares são regulados para não apresentar citotoxicidade no desenvolvimento embrionário (SENGOKU et al., 2001). A influência do NO na maturação de oócitos ocorre de acordo com a concentração intracelular do mesmo, e este padrão já foi constatado em outras espécies, como por exemplo em suínos (TAO et al., 2004) e camundongos (BU et al., 2004). Em bovinos, baixas concentrações de NO estimulam a maturação meiótica *in vitro*, enquanto a supressão ou os altos níveis geram um efeito inibitório (BILODEAU-GOESEELS, 2007).

A meiose é retomada a partir da redução dos níveis de AMPc por fosfodiesterases em oócitos imaturos concomitantemente com a diminuição dos níveis de GMPc e NO (figura 3) (TÖRNELL; BILLIG; HILLENSJÖ, 1990; PANDEY et al., 2010). Em contrapartida, quando a guanilato ciclase é ativa, os níveis de GMPc são mantidos pelo NO e, conseqüentemente, a parada meiótica é mantida, nem a inibição das fosfodiesterases desta via de sinalização é capaz de aumentar os níveis de AMPc (BOTIGELLI et al., 2017). O NO endógeno é essencial para a progressão inicial do embrião, no entanto, elevados níveis de NO são prejudiciais ao desenvolvimento embrionário e maturação oocitária (LEE et al., 2013).

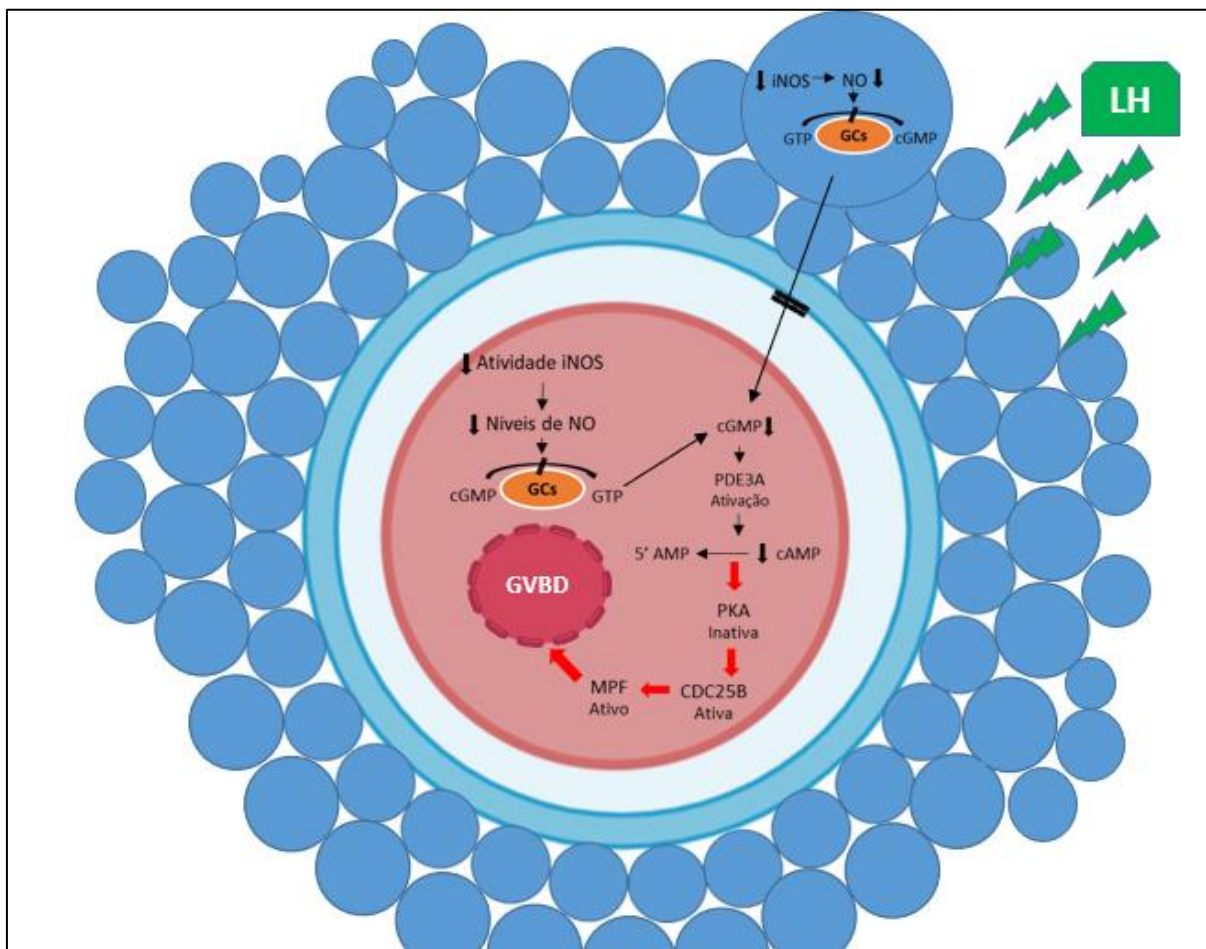


Figura 3. Retomada da meiose: NO como sinalizador. O estímulo de LH reduz a atividade da iNOS bloqueando a transferência de cGMP produzido pela via de Guanilato Ciclase solúvel (GCs). A atividade reduzida da iNOS/NO diminui o nível de cGMP intracelular, ativando a Fosfodiesterase 3 (PDE3A) que reduz o nível de cAMP gerado pelo oócito. A diminuição do nível de AMPc resulta na inativação da atividade da PKA, que por sua vez estimula a fosfatase CDC25B induzindo a atividade de MPF, retomando a meiose. Fonte: Adaptado de PANDEY et al. (2010).

2.5 Princípio dos 3Rs e *screening* toxicológico de moléculas

RUSSELL e BURCH (1959) foram os pioneiros a propor a utilização de metodologias mais racionais para a realização de experimentos com modelos animais, desta forma sugeriram os 3Rs: *Replacement*, *Reduction* e *Refinement*. No entanto, para substituir a utilização de animais vivos em experimentos é crucial intensificar o desenvolvimento de ferramentas que auxiliem neste processo. É necessário que o modelo animal seja apropriado para a reprodutibilidade fidedigna dos dados, o que acaba diminuindo o número de amostras biológicas a serem utilizadas e, por fim, é necessário dispor de novas tecnologias e de treinamento em experimentação animal para propiciar conforto e reduzir a ocorrência de negligências em relação ao bem-

estar dos animais utilizados CLARK, 2018). É de suma importância estabelecer um consenso entre a regulamentação ética das pesquisas executadas, a utilização de animais e a necessidade da comunidade científica, a fim de que o público alvo confie nos resultados apresentados (CLARK, 2018). Exceto alguns testes de irritação e sensibilização que necessitam da utilização de modelos animais, uma alternativa plausível apresentada para reduzir o uso de animais é a utilização de testes *in vitro*, os quais demonstraram ser tecnologias eficazes e altamente sofisticadas em referência aos testes *in vivo* (MYERS et al., 2017).

Os estudos que utilizam ensaios de toxicidade *in vitro* demonstraram um crescimento exponencial, pois diminuem a quantia de compostos manipulados, e em consequência, aumentam os rendimentos das análises realizadas, essencial para replicar dados de qualidade (BLOMME; WILL, 2016). Nas análises de toxicidade reprodutiva *in vitro* o modelo mais comumente utilizado para investigar compostos embriotóxicos são células tronco embrionárias e embriões inteiros de camundongos obtidos através de técnicas como a PIVE. Estes testes são validados e amplamente utilizados (GENSCHOW et al., 2002). Outra possibilidade é a utilização de amostras biológicas como ovários provenientes de abatedouros bovinos, para elucidar eventos reprodutivos com o gameta feminino, por haver semelhança em vários aspectos da foliculogenese com outras fêmeas monovulatórias (CAMPBELL et al., 2003; VAN WOUDEMBERG et al., 2012). Tanto a MIV quanto a PIVE de bovinos são biotécnicas reprodutivas utilizadas para o *screening* de moléculas, e sistemas de entrega de fármacos e novos compostos sintéticos que possam apresentar um potencial risco toxicológico ao sistema reprodutivo, e ainda, favorece a implementação do princípio dos 3Rs (VAN WOUDEMBERG et al., 2012; KOMNINOU et al., 2016; REMIÃO et al., 2016; LUCAS et al., 2017).

2.6 Lectinas

Peter Hermann Stillmark, ao longo de sua tese de doutorado em 1888, isolou pela primeira vez a partir de semente de mamonas (*Ricinus communis*) uma proteína denominada “ricina”. Ele constatou em seus estudos que se tratava de uma toxina e, em seguida, relatou uma atividade hemaglutinante por parte deste extrato de proteína purificado (STILLMARK, 1888). O termo “aglutinina” foi utilizado posteriormente com

a descoberta de novas proteínas com esta função (ELFSTRAND, 1898). Após anos de pesquisa, foi então evidenciada a relação destas proteínas com a atividade de aglutinação, visto que as mesmas tinham seus efeitos inibidos pela utilização de açúcares, então, foi relatado que a estrutura da proteína poderia interagir com os carboidratos que estão dispostos na superfície de hemácias (WATKINS; MORGAN, 1952). A definição de lectinas comumente aceita foi descrita por Peumans e Van Damme (1995), quando as classificaram como proteínas que se ligam reversivelmente a um mono ou oligossacarídeo de forma altamente específica e que dispõem de, ao menos, um domínio não catalítico de origem não imunogênica.

Com base em sua estrutura evolutiva e molecular, as lectinas foram classificadas em 12 subfamílias: Família *Agaricus bisporus* aglutinina (ABA), comumente encontrada em fungos e também extraída de *Marchantia polymorpha*; A família das Amarantinas que foi isolada primeiramente de *Amaranthus caudatus*; A família dos Homólogos da quitinase classe V (CRA) isolada de *Robinia pseudoacacia*; Família Cianovirina isolada de extratos do *Nostoc ellipsosporum* da cianobactéria; Família da lectina *Euonymus europaeus* (EUL); A família *Galanthus nivalis* aglutinina (GNA) extraída de monocotiledôneas como as Liliopsida; Família da Heveína, lectina descoberta no látex de *Hevea brasiliensis*; A família das lectinas associadas as Jacalinas (JRL) encontradas em um subgrupo pequeno da família *Moraceae*; Família das lectinas leguminosas; As Domínio Lisina (domínio LysM), envolvidas na sinalização celular; As lectinas da família Nictaba, isoladas de folhas de tabaco e a família ricina B, a qual foi a primeira lectina descoberta e isolada de ricina da mamona (*Ricinus communis*) (VAN DAMME; LANNON; PEUMANS, 2008). Determinadas características auxiliam a compreender a atividade destas proteínas de acordo com sua propriedade química de ligação, desta forma, as lectinas foram classificadas conforme a presença de domínios de ligação a carboidratos (LAGARDA-DIAZ; GUZMAN-PARTIDA; VAZQUEZ-MORENO, 2017). As merolectinas estruturalmente possuem um único domínio e, por consequência, as mesmas são incapazes de aglutinar células e glicoconjugados. As denominadas hololectinas, que possuem dois domínios idênticos de ligação a carboidratos, e por esta característica, são capazes de aglutinar células e glicoconjugados. Já as quimerolectinas, que possuem um domínio com atividade catalítica ou biológica independente e dois domínios de ligação a carboidratos, são chamadas de proteínas de fusão. As superlectinas, que dispõem

de ao menos dois domínios de ligação a carboidratos distintos, ou seja, estruturalmente conseguem reconhecer dois açúcares com especificidade diferente. E por fim as multilectinas, que apresentam dois domínios de ligação idênticos, mas que podem se ligar a carboidratos distintos (PEUMANS; VAN DAMME, 1995; VAN DAMME; LANNOO; PEUMANS, 2008). De fato, a classificação por especificidade de domínios ligantes a carboidrato é aplicada para distinguir as diferentes classes de lectinas e, a partir desta identificação, foram intitulados grupos para domínios intrínsecos de monossacarídeos, a título de exemplo, as lectinas de ligação L-fucose, D-glucose/D-mannose, D-galactose/Nacetil-D-galactosamina (VAN DAMME, 2014).

Com o aumento das investigações em torno destas proteínas, inúmeras lectinas foram isoladas de organismos distintos como animais, vírus, bactérias, sendo possível aprimorar o conhecimento sobre a sua atividade e interação como uma molécula de reconhecimento celular (SHARON; LIS, 2004; VAN DAMME, 2014; COELHO et al., 2017). Além disso, as lectinas desempenham um papel muito importante em diversos eventos biológicos. Algumas atuam em vias apoptóticas e antitumorais (LIU et al., 2012), auxiliam em processos a respostas inflamatórias e imunomoduladoras (RABINOVICH; RUBINSTEIN; TOSCANO, 2002), estimulam a proliferação celular (CARVALHO et al., 2018) e cicatrização de tecidos (GONZAGA DO NASCIMENTO-NETO et al., 2012) e também demonstram atividade antioxidante (E LACERDA et al., 2017), antimicrobiana (SINGH; KAUR; SINGH, 2014) e antiviral (VAN BREEDAM et al., 2014; AKKOUH et al., 2015). Ainda, alguns estudos sugerem a utilização destas proteínas no controle de pragas agrícolas por sua atividade antifúngica e termiticida (SOUZA et al., 2011). Compreender os eventos de interação proteína-carboidrato, suas modificações e atividade estrutural em relação aos gliconjugados em processos fisiológicos é crucial, pois as lectinas são potenciais ferramentas para o desenvolvimento de fármacos ou até mesmo para o diagnóstico de doenças (SHANMUGHAM et al., 2006).

2.6.1 Lectina da *Bauhinia forficata*

Devido a uma ampla pesquisa em relação às lectinas e suas atividades biológicas, estas proteínas garantem resultados promissores a futuras aplicações em produtos biotecnológicos (TEIXEIRA et al., 2012). Inicialmente, foi relatado que havia grande quantidade desta proteína em sementes, principalmente de plantas da família

Leguminosae, de onde foi isolada esta proteína pela primeira vez. Este grupo de lectinas possuem especificidades distintas a carboidratos, porém são estruturalmente semelhantes (SHARON; LIS, 1990; TEIXEIRA et al., 2012). De fato, inúmeras famílias de lectinas foram identificadas e caracterizadas em diferentes fragmentos vegetais, dentre elas, destacam-se as lectinas isoladas de sementes do gênero *Bauhinia*, estruturalmente semelhante a outras do mesmo gênero já com muitas aplicações relatada na literatura, como por exemplo a lectina isolada da *Bauhinia variegata* (BvL), a qual possui atividade intrínseca na cicatrização de feridas (NETO et al., 2011; SILVA et al., 2012; REIS et al., 2014).

Faria e colaboradores (2004) descreveram pela primeira vez a presença de uma lectina na semente da *Bauhinia forficata* (nBfL), uma planta leguminosa comumente conhecida como “pata-de-vaca”. Posteriormente, SILVA et al (2012) identificaram a atividade anticoagulante da nBfL e detalharam o processo de purificação, o qual ainda não era totalmente esclarecido, além disso, relataram a estrutura primária desta glicoproteína. A nBfL foi caracterizada como um monômero de 27,0 kDa de massa molecular em uma cadeia polipeptídica de 233 aminoácidos, que apresenta N-glicosilação nas asparginas 26 e 108, e que se liga ao carboidrato N-acetilgalactosamina (SILVA et al., 2012; LUBKOWSKI et al., 2017). Para efetivamente comprovar os efeitos biológicos destas proteínas, é essencial que as modificações pós-tradução sejam compreendidas quanto à sua influência na função, direcionamento e interação com os carboidratos específicos (STREICHER; SHARON, 2003).

A tecnologia do DNA recombinante na clonagem e expressão de proteínas em hospedeiros heterólogos, auxilia no processo de purificação, análise estrutural, caracterização e identificação de modificações pós-traducionais para poder investigar as atividades destas lectinas (STREICHER; SHARON, 2003; OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2013). Visto que, tanto a especificidade quanto a atividade de lectinas recombinantes podem ser diferentes das proteínas oriundas das plantas, denominadas “proteínas nativas” (STREICHER; SHARON, 2003). Há inúmeras vantagens na utilização desta ferramenta para o aprimoramento de bioprocessos na produção e purificação destas proteínas recombinantes, por isso, esta metodologia se torna altamente eficiente em relação à disponibilidade de proteína expressa (OLIVEIRA; TEIXEIRA; DOMINGUES, 2013). Ademais, verifica-se uma otimização no

processo de expressão destas proteínas de forma recombinante, uma vez que o tempo de expressão é consideravelmente menor (GEMEINER et al., 2009). Neste sentido, a partir da análise do sequenciamento genômico da *B.forficata*, agregando a tecnologia do DNA recombinante, foi possível expressar a lectina presente nesta planta em um organismo heterólogo e, com o objetivo de verificar sua atividade, utilizamos a maturação *in vitro* de oócitos bovinos como modelo de avaliação toxicológica.

3 HIPÓTESE E OBJETIVOS

3.1 Hipótese

A Lectina recombinante de *B.forficata* pode influenciar na expressão de genes que estão relacionados à vias de estresse oxidativo na maturação *in vitro* de oócitos bovinos por ter propriedade antiproliferativa.

3.2 Objetivo Geral

Determinar o efeito da adição de lectinas recombinantes sobre o estresse oxidativo na maturação *in vitro* de oócitos bovinos.

3.3 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações das lectinas recombinantes de *B.forficata* no progresso de expansão das células do *cumulus* e maturação nuclear *in vitro* de oócitos bovinos;
- Observar a influência de diferentes concentrações das lectinas recombinantes de *B.forficata* na produção de Oxido Nítrico (NO) após a maturação *in vitro* de oócitos bovinos;
- Verificar a expressão de genes relacionados a vias de estresse oxidativo nos Complexos *Cumulus* Oócito de bovinos maturados *in vitro* sob tratamento com lectinas recombinantes de *B.forficata*;

4 MANUSCRITO

4.1 Manuscrito – Effect of the addition of *Bauhinia forficata* recombinant lectins on oxidative stress *in vitro* maturation of bovine oocytes

Manuscrito formatado de acordo com as normas da Revista *Toxicology in Vitro*.

Fator de Impacto: 3,067

ISSN: 08872333

Qualis Biotecnologia (CAPES): A2

.

Effect of the addition of *Bauhinia forficata* recombinant lectins on oxidative stress *in vitro* maturation of bovine oocytes

Morgana Alves Borges^a; Fernanda S.S. Sousa^a; Júlia Damé Paschoal^a; Isadora A. R. Lopes^a; Ana Laura da S. Feijó; Luciano da Silva Pinto^b; Tiago Collares^{a*}

^a*Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Grupo de Pesquisa em Oncologia Celular e Molecular, Laboratório de Biotecnologia do Câncer, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas 96010-610, RS, Brazil;*

^b*Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPGB), Laboratório de Bioinformática e Proteômica Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas (UFPel) - Pelotas – RS, Brazil*

* Corresponding author:

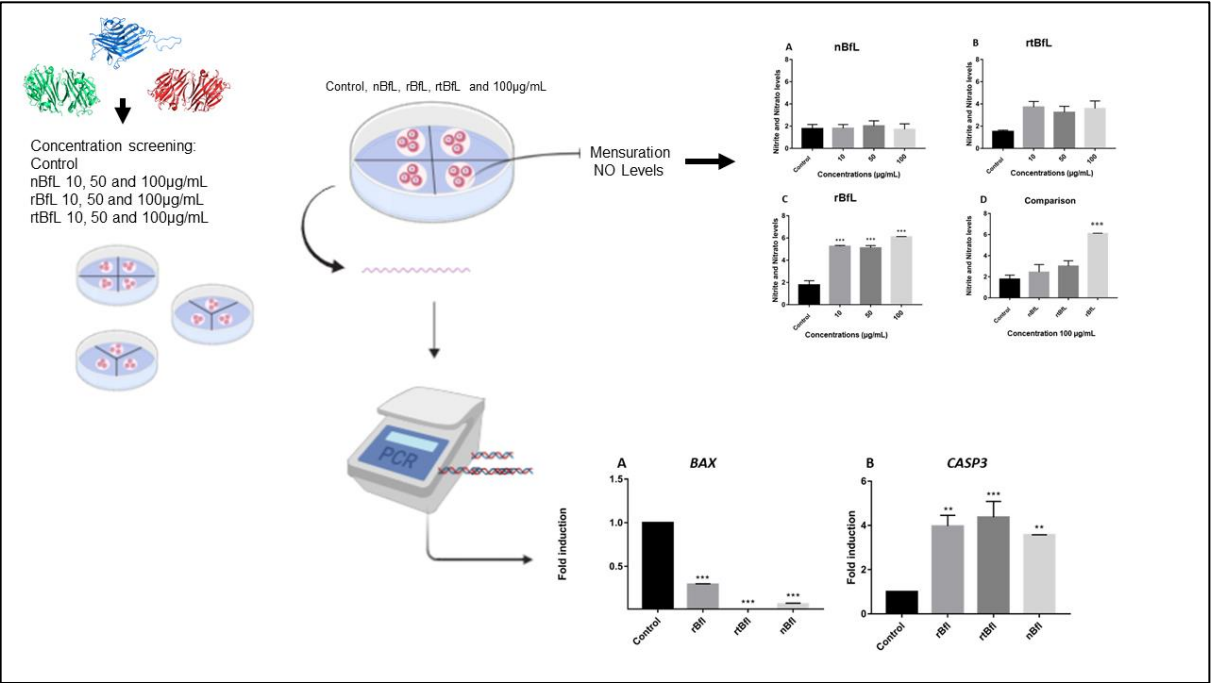
Tiago Collares, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário s/n, Capão do Leão, RS, Brazil, Cep: 96010-900. RS, Brazil; E-mail: collares.t@gmail.com; Phone number: +555332757350;

Abstract

The similarity in several aspects in folliculogenesis with monovulatory females makes *in vitro* maturation (IVM) of bovine oocytes important tool for study to female reproductive. This reproductive biotechnology is widely used for screening of molecules and serves as a model for toxicological investigation in process reproductive for humans. The lectin of *Bauhinia forficata* (nBfL) is a protein able to bind reversibly to N-acetylgalactosamine, performing several functions and one of them is the antiproliferative activity in tumor cells, but its effects have not yet been evaluated in female gametes. The objective of the present study was to determine addition effect of *B. forficata* recombinants lectins in the medium of maturation *in vitro* of bovine oocytes in expression of genes related to oxidative stress pathways. To get the proteins, the gene for this recombinant lectin (rBfL) and its truncated isoform (rtBfL) were cloned and expressed in *Escherichia coli* (*E.Coli*). The oocytes obtained through follicular puncture were incubated in IVM medium for 24 hours containing concentrations of 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL of nBfL, rBfL and rtBfL, and a no treated group as a control. The expansion of the *cumulus oophorus* cells, the meiotic maturation stage, the nitric oxide (NO) levels in the maturation medium were evaluated. In the groups treated with the concentration of 100 µg / mL, the gene expression of genes involved in oxidative stress SOD2, CAT, GPX-1, GSR, NOS2 and apoptosis BAX, CASP3 were evaluated. The expansion of the *cumulus oophorus* cells of treated oocytes, as well as the nuclear maturation rate, was not statistically different from the control group, though rBfL increased NO levels in all treatments in relation to the control group. The rtBfL increased the expression of the SOD2, GSR and NOS2 genes and all the tested lectins increased the expression of the CASP3 gene compared to the control group. These findings indicate that the tested concentrations of the *B. forficata* recombinants lectins probably influence on expression of oxidative stress genes and increase the expression of the apoptotic gene CASP3 during *in vitro* maturation of bovine oocytes.

Keywords: Reproductive toxicology; Screening; Proteins; Oxidative stress.

Graphical Abstract:



1.Introduction

In vitro maturation (IVM) of bovine oocytes is a potential model of toxicity investigation in processes related to reproduction as an alternative methodology for the use of a large number of animals in experiments (Van Woudenberg et al., 2012). Corroborates with the implementation of the 3Rs (Replacement, Reduction and Refinement) principle (Russell; Burch, 1959), the IVM bovine oocyte is a *in vitro* cellular model that allows investigating the processes linked to the reproductive system of monovulatory species due to its numerous similarities in the progress of folliculogenesis (Campbell et al., 2003; Van Woudenberg et al., 2012). The oocyte maturation is an important stage, for during the fertilization process the oocyte is the cell that donates the cytoplasm and nutritionally supports the embryonic development (Mtango; Potireddy; Latham, 2008; Del Collado et al., 2016; Gandolfi and Brevini, 2010).

Molecules present in the oocyte microenvironment can disrupt bidirectional signaling and disrupt the normal functions necessary for oocyte competence (Dumesic et al., 2015). IVM associated to *in vitro* production of bovine embryos are potential reproductive biotechnologies for the screening of new molecules (Van Woudenberg et al., 2012). This methodology facilitates the toxicological analysis of synthetic bioactive molecules (Paschoal et al., 2020), new drug delivery systems (Komninou et al., 2016; Lucas et al., 2017) and from the supplementation of molecules in maturation medium it is possible to investigate gene modulations in oxidative stress pathways (Van Woudenberg et al., 2012; Sovernigo et al., 2017; Remião et al., 2016).

Structurally, the oocytes have carbohydrates and glycoproteins that act as communication intermediates on the its surface and are crucial for fertilization, especially the glycoconjugates and glycosaminoglycans present in the cumulus cell expansion process (Tanghe et al., 2004; Russell; Salustri, 2006). The lectin isolated of plants from genus *Bauhinia forficata* is a protein able to bind reversibly to carbohydrate N- acetylgalactosamine (Lubkowski et al., 2017; Cagliari et al., 2018). When expressed recombinant in *E.coli*, this protein it has antiproliferative activity in tumor cells *in vitro* (Da Silva Pinto et al., 2019). In fact, lectins are potential candidates as new drugs, so it is important to understand their modifications, interactions and its activity in relation to glycoconjugates physiological processes (Shanmugham et al., 2006). Thus, the use of the recombinant DNA technique facilitates the characterization, modulation and expression of proteins on a large scale,

methodology that used to edit proteins and add functions different from native proteins (Klafke et al., 2016; Da Silva Pinto et al., 2019).

Our research group had previously analyzed the toxicological effects of lectins from genus *Canavalia* on bovine sperm (Kaefer et al., 2013). However, no such study has ever assessed the activity of *B. forficata* recombinants lectins on oxidative stress in the female gamete. The objective of the present study was to determine addition effect of *B. forficata* recombinants lectins in the medium of maturation *in vitro* of bovine oocytes in expression of genes related to oxidative stress pathways.

2. Materials and Methods

2.1 Experimental design

The present experiment was based on previous proteomic studies on recombinant lectins from *B. forficata* (Da Silva Pinto et al., 2019). Two recombinant lectins rBfL and rtBfL expressed by *E.Coli* and one purified from *B. forficata* seeds with its native conformation (nBfL) were added to *in vitro* maturation medium of bovine oocyte. Viable oocytes were randomly distributed in drops of 100µL of IVM medium containing 10 µg/mL, 50 µg/mL and 100 µg/mL of the previously diluted lectins, and a control group without any treatment. After the incubation time for oocyte IVM, the gametes were evaluated for: Expansion of cumulus *oophorus* cells, nuclear maturation and levels of the nitric oxide (NO) in the IVM medium. Only the groups treated with the concentration of the 100 µg/mL of the recombinant lectins were evaluated the levels of gene expression of the oxidative stress genes NOS2, SOD2, CAT, GPX-1, GSR and genes apoptotics BAX, CASP3. The experiments were carried out in five replicates for each test.

2.2 Preparation and characterization of recombinant lectins *Bauhinia forficata* (BfL)

The protocols for the synthesis, characterization and purification of the recombinant proteins were carried out at the Bioinformatics and Proteomics Laboratory at Universidade Federal de Pelotas, according to Da Silva Pinto et al. (2019).

The N-acetylgalactosamine *B. forficata* native lectin binding sequence containing 233 amino acids and the molecular weight of approximately 27,0 kDa (Silva et al., 2012) was used

to align the sequences and the 3D structural prediction was performed using the PyMOL molecular visualization system (<https://pymol.org/>). The recombinant lectins were modeled in the in-silico process to evaluate their structure, once the construction of the rtBfL protein was edited, 15 amino acids were removed from its N-terminal portion to evaluate its activity without the binding domain.

2.3 Oocyte collection

Ovaries of Hereford and Angus cows (*Bos taurus*) from local bovine slaughterhouses (Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil) were collected randomly from the slaughter line, without identifying age, stage of the estrous cycle and clinical condition and nutritional status of females. The ovaries were transported to the laboratory in a thermic recipient, and later washed with 0.9% sterile NaCl solution at 32 - 35 ° C. Follicular fluid was aspirated from follicles with sizes between 2-8 mm in diameter using a sterile 18-gauge needle attached to a vacuum pump, and stored in a conical tube heated in a dry bath. Afterwards, the follicular fluid was washed with PBS and filtered through an embryo collection filter (Nutricell, Campinas, São Paulo, Brazil). The *cumulus* oocyte complexes (CCOs) were selected using a stereomicroscopic and maintained in TCM 199 Hepes medium (Gibco® Life Technologies™, Gibco® Life Technologies™, Carlsbad, California, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FCS; Gibco® Life Technologies™), 0.2 mM sodium pyruvate and amikacin 83.4 mg / mL (D'Altomare, Santo Amaro, São Paulo, Brazil) until transferred to a plate containing maturation medium. After obtaining the CCOs, those classified according to the morphological characteristics described by Blondin and Sirard (1995) were selected, having at least 3 to 4 layers of compact *cumulus* cells and uniformly granulated cytoplasm with homogeneous color.

2.4 In vitro maturation (IVM)

After the selection, groups of 15-20 CCOs were distributed in drops of 100µL of IVM medium under mineral oil. Then, the CCOs were treated with the respective concentrations of lectins described in the experimental design and incubated in a controlled atmosphere of 38.5 ° C and 5% CO₂ for 22–24 hour. The IVM medium was composed of TCM-199 (Gibco® Life Technologies™) supplemented with 10% FCS (Gibco, Thermo Fisher Scientific inc.), 1 µg / mL FSH (Folltropin-V1; Bioniche Animal Health, Belleville, Ontario, Canada), 50 IU / mL hCG (Profasi, Serono, Sao Paulo, Brazil), 1 µg / mL estradiol (17β-estradiol; Sigma-Aldrich Co.), 0.2 mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich Co.), and 83.4 µg / ml amikacin (Sigma-Aldrich Co.).

2.5 Assessment of cumulus oophorus cells expansion

After the incubation period for IVM, CCOs were evaluated according to the degree of expansion of the *cumulus oophorus* cells as described by Marei (2010). With a stereomicroscope, the *cumulus* cells were subjectively classified as fully expanded, partially expanded and not expanded.

2.6 Assessment of oocyte nuclear maturation

The evaluation of nuclear maturation was performed as described by Chankitisakul et al (2013) and Del Collado et al (2016).

After 24 hours of incubation, the *cumulus oophorus* cells were completely removed by successive pipetting using hyaluronidase (160 IU / mL) and the already denuded oocytes were washed three times in drops of 70 µL of PBS-PVP solution (1 µg / mL of polyvinylpyrrolidone in PBS). Then, the denuded oocytes were stained with Hoechst 33342 (10 µg/mL) for 30 min at 37 ° C in the dark. The oocytes were evaluated according to Van Woudenberg et al (2012), using an inverted fluorescent microscope (IX 71; Olympus, Tokyo, Japan) with UV filters from 330 to 385 nm, it was possible to identify the meiotic phase: Metaphase I (immature), Metaphase II (matured).

2.7 Assessment of nitric oxide (NO) levels

NO production is indicated by the accumulation of nitrate/nitrite. In this experiment, NO levels were measured following Granger et al (1996) protocol, with modifications.

The IVM medium, after the 24 hours of incubation with bovine oocytes were distributed in a 96-well microplate. It was added 90µL of medium and 90µL of Griess reagent (Sigma-Aldrich). Diazonium salts are formed from the sulfanilamide of the Griess reagent. The quantification of nitrate in the sample is measured by the interaction of the azo-compound (N-1-naphthylethylenediamine-dihydrochloride) with these salts. After 5 minutes in the dark, the absorbance was analyzed on a microplate reader at a wavelength range 492-600 nm.

2.9 RNA extraction, cDNA synthesis, and Real-Time PCR

To evaluate gene expression, a pool of 75 CCOs from each treatment was used. Total RNA extraction was performed using the RNeasy® Mini kit (Qiagen, Germany) as described by the manufacturer. Then, the cDNA was made using the reverse transcriptase reaction with the High Capacity cDNA Reverse Transcription® kit (Applied Biosystems, USA) following the instructions described in the manual. With the template ready, the reaction qRT-PCR Stratagene® Mx3005PTM (Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) was performed using the fluorophore SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, California, USA) and the amplification was performed under cycling conditions of 95 ° C for 2 minutes, followed by 40 cycles at 95 ° C for 15 seconds, 55-60 ° C for 60 seconds. The primers used in this experiment are listed in Table 1, and the relative levels of each transcript were calculated by normalizing the abundance of β -actin as an internal control. The gene expression data were analyzed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method from the C_t (thresholdcycle) values obtained in the qRT-PCR reaction (LIVAK, 2001).

Table 1. Details of primers used for gene expression analysis qRT-PCR.

Gene Name/ Symbol	NCBI Accession Number	Primer Source	Primer Sequence (5'-3')
β - actin	NM_173979.3	JIN et al., 2016	F-CAAGGACCTCTACGCCAAC R- AGAAGCATTTGCGGTGGAC
<i>BCL2</i> -associated X protein/ BAX	NM_173894	ABAZARIKIA et al., 2020	F- TCTGACGGCAACTTCAACTG R- TGGGTGTCCCAAAGTAGGAG
Apoptosis-related cysteine peptidase 3/ CASP3	NM_001077840.1	KOMNINOU et al.,2016	F: GGACCCGTC AATTTGAAAAA R: CATGTCATCCTCAGCACCAC
Catalase / CAT	NM_001035386.1	AMIN et al., 2014	F- TGGGACCCAACTATCTCCAG R- AAGTGGGTCCTGTGTTCCAG
Glutathione peroxidase-1/ GPX1	NM_174076.3	DEY et al., 2012	F- CATCGCTCTGAGGCACAACGGT R-TGCCCAAAGTGGTTGCAGGGGA
Glutathione reductase/ GSR	NM_001114190.2	JORSEN et al., 2015	F- GGGGATGTGTGTGGAAAAG R- ACTGTGGGGATGTTGTCATAG
Inducible nitric oxide synthase 2/ NOS2	DQ676956.1	MESALAM et al., 2017	F - CGAGCTTCTACCTCAAGCTATC R - CTGGCCAGATGTTCTCTATTT

Superoxide
dismutase-2/ SOD2

NM_201527.2

MOYES et al.,
2014

F- TGTGGGAGCATGCTTATTACCTT
R- TGCAGTTACATTCTCCCAGTTGA

3. Statistical analyses

Chi-square test was performed to compare the maturation rates and expansion of the *cumulus* oocyte complex cells. NO levels were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) and followed by the Tukey's test. Gene expression of CCOs was compared using one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons. The results were presented as the mean values for each data set $\pm$ standard error of the mean (SEM), in all analyzes a degree of statistical significance was defined at a probability level of $p < 0.05$.

4. Results

4.1 Structural analysis in-silico of recombinant lectins

According to the 3D prediction of the protein structure made in the PyMOL molecular visualization system (<https://pymol.org/>) (Figure 1), we observed that the recombinant protein rBfL containing 313 amino acids and a calculated molecular mass of 34,367.72 Da, is structurally similar to the nBfL protein. However, the recombinant protein rtBfL demonstrates to have a different structure from the other analyzed proteins, resulting from the removal of the binding domain in its N-terminal portion, the rtBfL protein contains 278 amino acids and the calculated molecular weight is approximately 30,524.20 Da.

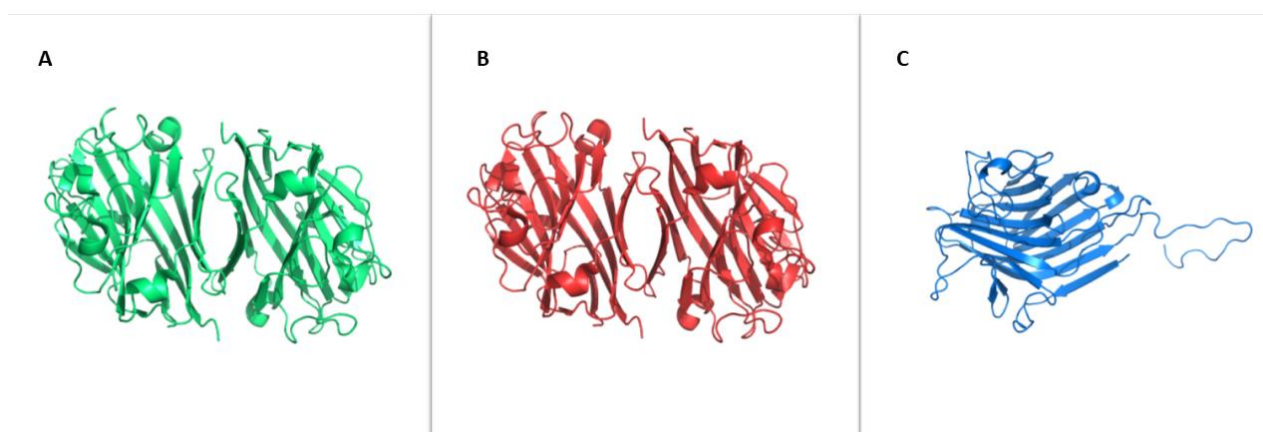


Figure 1. Protein structure 3D prediction using molecular visualization system PyMol. These alignments show the structural modification of the recombinant proteins in relation to the native protein, demonstrating changes in the binding site between the proteins: (A) nBfL; (B) rBfL and (C) rtBfL.

4.2 Oocyte maturation rates and cumulus cell expansion

The process of nuclear maturation of bovine oocytes *in vitro* was not significantly affected by concentrations of lectins tested, as well as no significant morphological changes were observed by analyzing the expansion of *cumulus* cells ($P > 0.05$) (Table 2).

Table 2. Oocyte maturation rate and *cumulus* cell expansion analysis.

Treatments	Oocytes	Oocyte at stage MII (%)	Cumulus cell expansion		
			Fully Expanded	Partially Expanded	Not Expanded
Control	82	41 (50.0)	71 (86.58)	10 (12.20)	1 (1.22)
nBfL 10µg/mL	74	44 (59.46)	64 (86.49)	9 (12.16)	1 (1.35)
nBfL 50µg/mL	75	47 (62.66)	70 (93.33)	5 (6.67)	-
nBfL 100µg/mL	74	39 (52.70)	57 (77.03)	15 (20.27)	2 (2.70)
rBfL 10µg/mL	87	35 (40.23)	76 (87.36)	10 (11.49)	1 (1.15)
rBfL 50µg/mL	88	41 (46.59)	75 (85.23)	12 (13.64)	1 (1.13)
rBfL 100µg/mL	91	54 (59.34)	76 (83.52)	13 (14.28)	2 (2.20)
rtBfL 10µg/mL	78	42 (53.84)	68 (87.18)	10 (12.82)	-
rtBfL 50µg/mL	73	41 (56.16)	70 (95.89)	3 (4.11)	-
rtBfL 100µg/mL	90	39 (43.33)	74 (82.22)	16 (17.78)	-

No differences in oocyte maturation rates and *cumulus* cells expansion were observed between treatments, $P > 0.05$. Data represents five replicates.

4.3 Quantification of nitric oxide levels

We observed that nBfL and rtBfL did not show a significant difference in any of the tested concentrations in relation to the control ($P > 0.05$). However, NO levels were significantly more externalized to the medium at all concentrations tested with rBfL when compared to the control group ($P < 0.05$). When comparing the highest concentration (100µg / mL) of nBfL, rtBfL and rBfL with the control group, we observed that rBfL had a significant increase in NO levels ($P < 0.05$) (Figure 3).

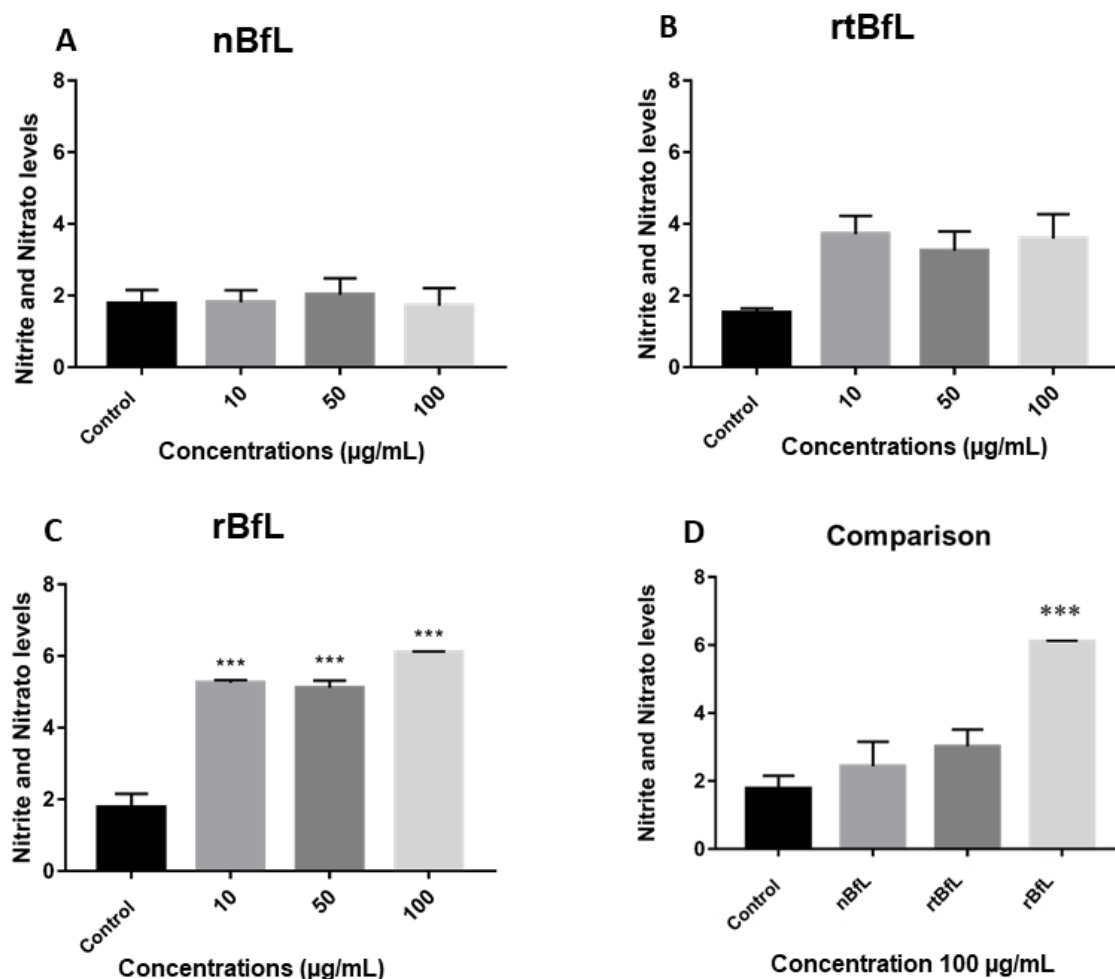


Figure 3. Effect of recombinant lectins on the quantification of nitric oxide in the maturation medium of bovine oocytes. (A) NO level present in the maturation medium treated with nBfL; (B) treated with rtBfL and (C) treated with rBfL. (D) Comparison of the highest concentration between the different treatments. *** Significant difference in relation to the control group ($P < 0.001$).

4.4 Effects of nBfL, rBfL and rtBfL on the expression of genes related to the oxidative stress

The transcription levels of the superoxide dismutase 2 (SOD2) gene were lower at the rBfL and higher at rtBfL treatment, in relation to the control (Figure 4A, $P < 0.01$). The catalase gene transcripts (CAT) were lower at rBfL and rtBfL treatments compared to the control (Figure 4B, $P < 0.001$). The quantification of transcription levels for the glutathione peroxidase (GPX) gene increased significantly at rBfL ($P < 0.001$) and decreased at nBfL treatment compared to the control group (Figure 4C, $P < 0.05$). The levels of the transcripts of the glutathione reductase (GSR) gene were significantly higher in rtBfL ($P < 0.001$) and rBfL ($P < 0.05$) compared to the control group (Figure 4D). The transcription of the nitric oxide synthase 2 (NOS2) gene was higher with the rtBfL ($P < 0.01$) and rBfL ($P < 0.05$) treatment when compared to the control group (Figure 4E).

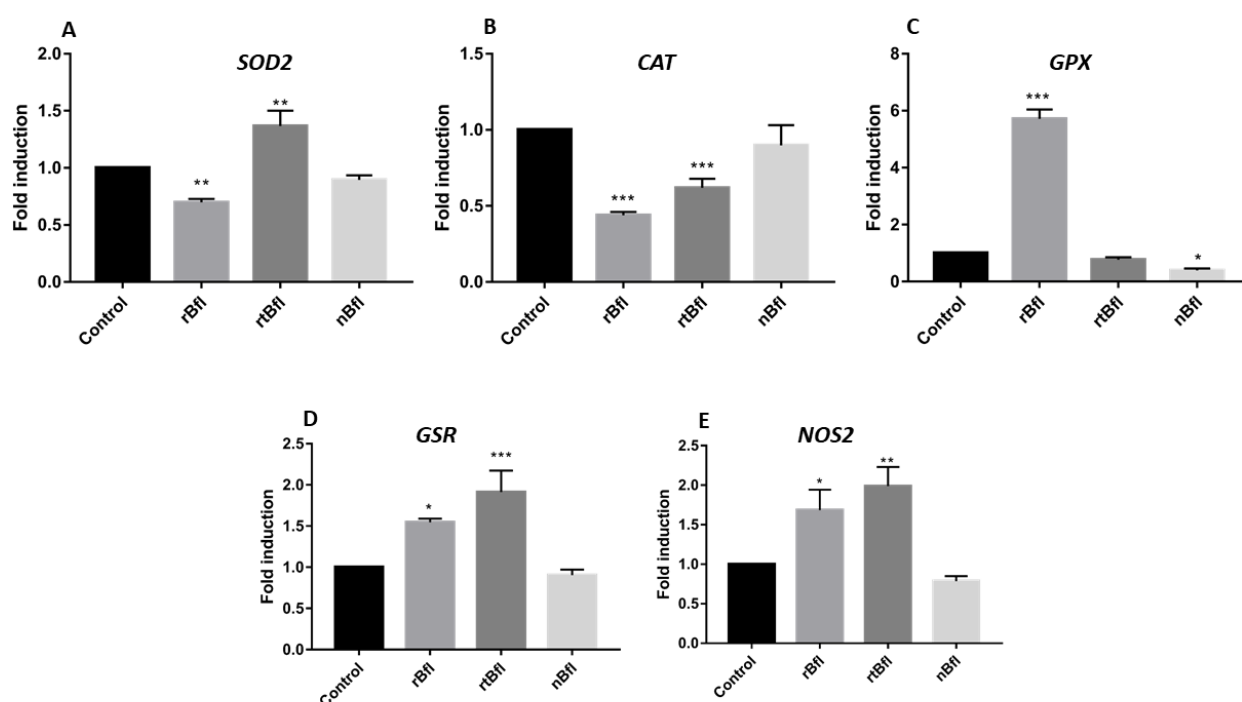


Figure 4. Effects of nBfL, rBfL and rtBfL at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ on the relative abundance of mRNA of oxidative stress related genes. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ significant difference in relation to the control group.

The relative abundance of protein X gene transcripts associated with pro-apoptotic BCL2 (BAX) was significantly lower in all treatments with nBfL, rBfL and rtBfL proteins compared to the control group (Figure 5A, $P < 0.001$). Finally, the transcription levels of the apoptosis-related cysteine peptidase 3 gene (CASP3) were significantly higher in the treatment with rtBfL ($P < 0.001$) than in treatments with rBfL ($P < 0.01$) and nBfL ($P < 0.01$) compared to the control group (Figure 5B, $P < 0.01$).

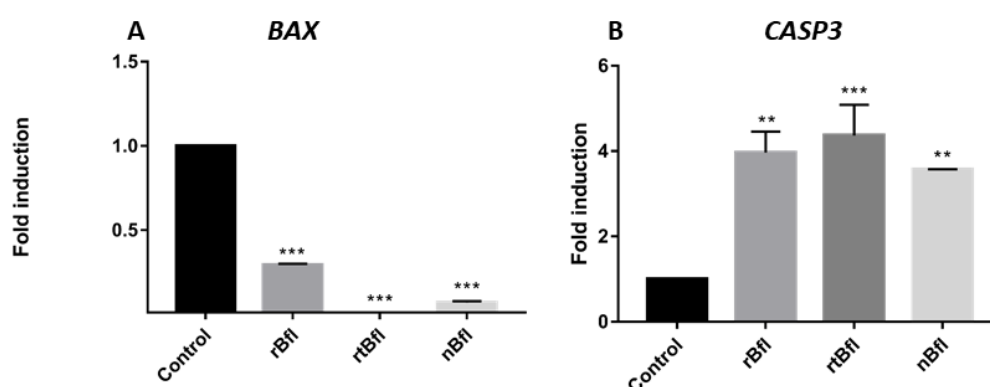


Figure 5. Effects of nBfL, rBfL and rtBfL at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ on the relative abundance of mRNA of genes related to apoptosis. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ significant difference in relation to the control group.

Discussion

Recombinant lectins of the *B. Forficata* is structurally similar to native protein, however, analyzing the data found by Lubkowski et al (2017) and Da Silva Pinto et al (2019), it is possible that its activity is modified by the lack of N-glycosylation and the addition of two Ca^{2+} ions, instead of one Ca^{2+} and one Mn^{2+} in the rBfL protein. Nogueira et al (2002), states that changes in the binding site can diversify the association profile with carbohydrates in these proteins, and thus, different molecules can bind to the active site changing the function of these proteins. Previous studies have already reported considerable differences between nBfL, rBfL and rtBfL at their binding site, demonstrating that recombinantly expressed lectins can be designed to acquire activities distinct from native lectin protein (Da Silva Pinto et al., 2019).

The cellular expansion of CCOs during the oocyte maturation process *in vitro* contributes as a factor of morphological evaluation in the maturation analysis, therefore, its inhibition suggests the reduction or inhibition of oocyte competence (Marei et al., 2010). In this experiment, the different concentrations of the recombinant lectins that were added to the

bovine oocyte IVM medium did not alter the cumulus oophorus cell expansion rates, nor the nuclear maturation. Previously, it was reported that the action of lectins with low mitogenic activity did not interfere with the morphology of mouse CCOs (Funsho, 1990). We believe that the concentrations of lectins tested in this experiment were not sufficient to cause the inhibition of cumulus cell expansion, suggesting that cumulus cells may express gluconjugates that have an affinity for these lectins, as reported in previous studies with lectins in oocytes bovines (Supplizi et al., 1996), porcines (Parillo et al., 2003) and equines (Desantis et al., 2009).

The levels of free radical NO expelled to the oocyte maturation medium during IVM was analyzed as a methodology for quantifying oxidative stress. In the concentration of 100 µg / mL, rBfL quantitatively increased the NO levels that the cells externalized to the medium when compared to the same concentration of rtBfL and nBfL. As reported by Saeed-Zidane et al (2017), the granulosa cells, when exposed to oxidative stress conditions react to stress by activating intracellular antioxidant cascades and releasing them as exosomes. We believe that NO can be released into the extracellular environment when produced in large amounts intracellular. Free radical NO plays a fundamental role in oocyte maturation, and is involved in several physiological processes during follicular development as vital component of the oocyte microenvironment (Basini; Grasselli, 2015). However, Bu et al (2003) observed that NO can have a double action, where low concentrations of NO derived from eNOS in cumulus cells can stimulate maturation, while high concentrations inhibit meiotic progress in mice. In our results, no significant meiotic blocking activities were observed in the analysis of oocyte maturation, so we believe that these changes in extracellular NO levels may interfere transcriptionally in the pathways associated with the response to oxidative stress.

In the analyzes of the gene expression, the results obtained suggest that the increased levels of NOS2 in rBfL treatment may have mediated an oxidative stress response not through the CAT pathway, since its expression was significantly decreased in relation to the control group, but through the GPX / GSR pathway, where we observed greater expression levels. However, SOD2 levels were less expressed with the treatment of rBfL protein compared to the control group, suggesting that this antioxidant defense pathway was less active. Regarding treatment with rtBfL protein, a significant increase in expression of gene NOS2 was observed, suggesting an imbalance in antioxidant defenses. The high expression of SOD2 and decrease in CAT, demonstrates that from the GPX pathway, which was being expressed at levels similar to the control group, treatment with rtBfL mediated an oxidative stress response that is proven with the increase in the expression of the cofactor gene GSR. Corroborating with the results of

Deponte (2013), who reports that GSR enzyme catalyzes the reduction of GSSG in GSH in order to maintain the intracellular oxidative balance, and its expression is essential to ensure the maintenance of antioxidant defenses in the repair of damage caused by free radicals. The variation in the antioxidant defense pathway can be observed mainly in mammalian cells, as there are numerous pathways which inhibit the damage caused mainly to cellular components sensitive to changes in the redox system such as proteins, DNA and lipids (Bryan et al., 2013; Saeed-Zidane et al., 2017).

We observed that the expression of the BAX gene was significantly reduced and the levels of expression of CASP3 was significantly increased with the treatment in the highest concentration of the all lectins tested in relation to the control group. According to Agarwal et al (2012), the excessive production of ROS in the granulosa cells is one of the main influences on apoptosis in process of the follicular atresia and the increase in the expression of genes related to oxidative stress can modulate the expression of apoptotic genes in granulosa cells (Sohel et al., 2019). The high expression of the Casp 3 gene leads us to believe that treatment with the highest concentrations of tested lectins triggers a process of apoptosis by extrinsic route in bovine oocytes matured in vitro. Since external factors are responsible for inducing the apoptosis mechanism by extrinsic pathways, through receptors in the cell membrane that by activating the super family of tumor necrosis factors (FAS and TNF) bind to their respective receptors (FASL and TNF α), and signal the activation of amplification of the cascade of caspases (Hutt, 2015; Tripathi; Chaube, 2015). Activated capase 3 acts by cleaving the main regulatory structural proteins, and this induces DNA fragmentation, a characteristic event of programmed cell death (Jurisicova; Acton 2004).

To the best of our knowledge, this was the first study in the literature to evaluate the effects of recombinant *B. forficata* lectins on bovine oocyte IVM. Our findings indicate that in IVM of bovine oocytes the recombinants proteins of lectin *B. forficata* are able to stimulate the expression of genes related to oxidative stress and to stimulate the expression of the CASP3 apoptotic gene. Future research to elucidate which are the molecular pathways of inducing apoptosis by lectins may become important for the development of bioactive molecules and potential biotechnological products.

Acknowledgements

This study was supported by the Brazilian funding agency Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

Abazarikia, A. H., Zhandi, M., Shakeri, M., Towhidi, A., & Yousefi, A. R. (2020). *In vitro* supplementation of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid ameliorated deleterious effect of heat stress on bovine oocyte developmental competence. *Theriogenology*, 142, 296-302. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2019.10.028>

Agarwal A, Aponte-Mellado A, Premkumar BJ et al (2012) The effects of oxidative stress on female reproduction: a review. *Reprod Biol Endocrinol* 10:49. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-49>

Amin, A., Gad, A., Salilew-Wondim, D., Prastowo, S., Held, E., Hoelker, M., ... & Schellander, K. (2014). Bovine embryo survival under oxidative-stress conditions is associated with activity of the NRF2-mediated oxidative-stress-response pathway. *Molecular reproduction and development*, 81(6), 497-513. <https://doi.org/10.1002/mrd.22316>

Basini, G., & Grasselli, F. (2015). Nitric oxide in follicle development and oocyte competence. *Reproduction*, 150(1), R1-R9. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0524>

Blondin, P., & Sirard, M. A. (1995). Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. *Molecular reproduction and development*, 41(1), 54-62. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080410109>

Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E., & Park, B. K. (2013). The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and-independent mechanisms of regulation. *Biochemical pharmacology*, 85(6), 705-717. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.11.016>

Bu, S., Xia, G., Tao, Y., Lei, L., & Zhou, B. (2003). Dual effects of nitric oxide on meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes in vitro. *Molecular and cellular endocrinology*, 207(1-2), 21-30. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(03\)00213-2](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(03)00213-2)

Cagliari, R., Kremer, F. S., & da Silva Pinto, L. (2018). Bauhinia lectins: biochemical properties and biotechnological applications. *International journal of biological macromolecules*, 119, 811-820. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.156>

Campbell, B. K., Souza, C., Gong, J., Webb, R., Kendall, N., Marsters, P., ... & Baird, D. T. (2003). Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *REPRODUCTION-CAMBRIDGE-SUPPLEMENT*, 429-443. PMID: 14635953

Chankitisakul, V., Somfai, T., Inaba, Y., Techakumphu, M., Nagai, T., 2013. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. *Theriogenology* 79, 590–598. <https://dx.doi.org/10>

Chaubé, S. K., Prasad, P. V., Thakur, S. C., & Shrivastav, T. G. (2005). Hydrogen peroxide modulates meiotic cell cycle and induces morphological features characteristic of apoptosis in rat oocytes cultured in vitro. *Apoptosis*, 10(4), 863-874. <https://doi.org/10.1007/s10495-005-0367-8>

Da Silva Pinto, L., Cardoso, G., Kremer, F. S., dos Santos Woloski, R. D., Dellagostin, O. A., & Campos, V. F. (2019). Heterologous expression and characterization of a new galactose-binding lectin from *Bauhinia forficata* with antiproliferative activity. *International journal of biological macromolecules*, 128, 877-884. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.01.090>

Del Collado, M., Saraiva, N.Z., Lopes, F.L., Gaspar, R.C., Padilha, L.C., Costa, R.R., Rossi, G.F., Vantini, R., Garcia, J.M., 2016. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during in vitro maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* 28, 1721–1732. <https://doi.org/10.1071/RD15067>.

Deponte, M. (2013). Glutathione catalysis and the reaction mechanisms of glutathione-dependent enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1830(5), 3217-3266. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.09.018>

Desantis, S., Ventriglia, G., Zizza, S., De Santis, T., Di Summa, A., De Metrio, G., & Dell'Aquila, M. E. (2009). Lectin-binding sites in isolated equine cumulus-oocyte complexes: Differential expression of glycosidic residues in complexes recovered with compact or expanded cumulus. *Theriogenology*, 72(3), 300-309 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2009.01.025>

Dey, S. R., Deb, G. K., Ha, A. N., Lee, J. I., Bang, J. I., Lee, K. L., & Kong, I. K. (2012). Coculturing denuded oocytes during the in vitro maturation of bovine cumulus oocyte complexes exerts a synergistic effect on embryo development. *Theriogenology*, 77(6), 1064-1077. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2011.10.009>

Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and sterility*, 103(2), 303-316. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.11.015>

Funsho Fagbohun, C., & Downs, S. M. (1990). Maturation of the mouse oocyte-cumulus cell complex: stimulation by lectins. *Biology of reproduction*, 42(3), 413-423. <https://doi.org/10.1095/biolreprod42.3.413>

Gandolfi, F., Brevini, T.A.L., 2010. In vitro maturation of farm animal oocytes: a useful tool for investigating the mechanisms leading to full-term development. *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 495–507. <https://doi.org/10.1071/RD09151>

Genschow, E., Spielmann, H., Scholz, G., Seiler, A., Brown, N., Piersma, A., ... & Bremer, S. (2002). The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. *Alternatives to Laboratory Animals*, 30(2), 151-176. <https://doi.org/10.1177/026119290203000204>

Granger, D. L., Taintor, R. R., Boockvar, K. S., & Hibbs Jr, J. B. (1996). Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. In *Methods in enzymology* (Vol. 268, pp. 142-151). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)68016-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)68016-1)

Griess, P. (1879). Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen” . *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 12(1), 426-428. <https://doi.org/10.1002/cber.187901201117>

Hutt, K. J. (2015). The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. *Reproduction*, 149(2), R81-R89. <https://doi.org/10.1530/REP-14-0422>

Jin, X. L., Wang, K., Liu, L., Liu, H. Y., Zhao, F. Q., & Liu, J. X. (2016). Nuclear factor-like factor 2-antioxidant response element signaling activation by tert-butylhydroquinone attenuates acute heat stress in bovine mammary epithelial cells. *Journal of dairy science*, 99(11), 9094-9103. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11031>

Jorssen, E. P., Vergauwen, L., Goossens, K., Hagenars, A., Van Poucke, M., Petro, E., ... & Bols, P. E. (2015). Optimisation of the bovine whole in vitro embryo system as a sentinel for toxicity screening: a cadmium challenge. *Alternatives to Laboratory Animals*, 43(2), 89-100. <https://doi.org/10.1177/026119291504300204>

Juriscicova, A., & Acton, B. M. (2004). Deadly decisions: the role of genes regulating programmed cell death in human preimplantation embryo development. *Reproduction*, 128(3), 281-291. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00241>

Kaefer, C., Komninou, E. R., Campos, V. F., de Leon, P. M., Arruda, F. V. S., Nascimento, K. S., ... & Seixas, F. K. (2013). Binding pattern and toxicological effects of lectins from genus *Canavalia* on bovine sperm. *Reproductive Toxicology*, 38, 72-80. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2013.03.003>

Klafke, G. B., Moreira, G. M. S. G., Pereira, J. L., Oliveira, P. D., Conceição, F. R., Lund, R. G., ... & da Silva Pinto, L. (2016). Lectin I from *Bauhinia variegata* (BVL-I) expressed by *Pichia pastoris* inhibits initial adhesion of oral bacteria in vitro. *International journal of biological macromolecules*, 93, 913-918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.09.062>

Komninou, E. R., Remião, M. H., Lucas, C. G., Domingues, W. B., Basso, A. C., Jornada, D. S., ... & Seixas, F. K. (2016). Effects of two types of melatonin-loaded nanocapsules with distinct supramolecular structures: polymeric (NC) and lipid-core nanocapsules (LNC) on bovine embryo culture model. *PloS one*, 11(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157561>

Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *methods*, 25(4), 402-408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

Lubkowski, J., Durbin, S. V., Silva, M. C., Farnsworth, D., Gildersleeve, J. C., Oliva, M. L. V., & Wlodawer, A. (2017). Structural analysis and unique molecular recognition properties of a *Bauhinia forficata* lectin that inhibits cancer cell growth. *The FEBS journal*, 284(3), 429-450. <https://doi.org/10.1111/febs.13989>

Lucas, C. G., Remião, M. H., Bruinsmann, F. A., Lopes, I. A., Borges, M. A., Feijo, A. L. S., ... & Seixas, F. K. (2017). High doses of lipid-core nanocapsules do not affect bovine embryonic development in vitro. *Toxicology In Vitro*, 45, 194-201. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.09.013>

Marei, W.F., Wathes, D.C., Fouladi-Nashta, A.A., 2010. Impact of linoleic acid on bovine oocyte maturation and embryo development. *Reproduction* 139, 979–988. <https://doi.org/10.1530/REP-09-0503>

Mesalam, A., Khan, I., Lee, K. L., Song, S. H., Chowdhury, M. M. R., Uddin, Z., ... & Kong, I. K. (2017). 2-Methoxystypane improves in vitro-produced bovine embryo quality

through inhibition of IKBKB. *Theriogenology*, 99, 10-20.

<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2017.05.012>

Moyes, K. M., Graugnard, D. E., Khan, M. J., Mukesh, M., & Loor, J. J. (2014). Postpartal immunometabolic gene network expression and function in blood neutrophils are altered in response to prepartal energy intake and postpartal intramammary inflammatory challenge. *Journal of dairy science*, 97(4), 2165-2177. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7433>

Mtango, N. R., Potireddy, S., & Latham, K. E. (2008). Oocyte quality and maternal control of development. *International review of cell and molecular biology*, 268, 223-290. [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)00807-1](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)00807-1)

Neto, L. G. D. N., Pinto, L. D. S., Bastos, R. M., Evaristo, F. F. V., Vasconcelos, M. A. D., Carneiro, V. A., ... & Cavada, B. S. (2011). Effect of the lectin of *Bauhinia variegata* and its recombinant isoform on surgically induced skin wounds in a murine model. *Molecules*, 16(11), 9298-9315. <https://doi.org/10.3390/molecules16119298>

Nogueira, N. A., Grangeiro, M. B., da Cunha, R. M., Ramos, M. V., Alves, M. A., Teixeira, E. H., ... & Grangeiro, T. B. (2002). Expression and purification of the recombinant ConBr (*Canavalia brasiliensis* lectin) produced in *Escherichia coli* cells. *Protein and peptide letters*, 9(1), 59-66. <https://doi.org/10.2174/0929866023408968>

Parillo, F., Dallâ, C., Supplizi, A. V., Ceccarelli, P., & Gargiulo, A. M. (2003). Immunogold study on lectin binding in the porcine zona pellucida and granulosa cells. *European Journal of Histochemistry*, 353-358. <https://doi.org/10.4081/846>

Paschoal, J. D. F., Lopes, I. A., Borges, M. A., Feijó, A. L., Simões, L. D., Segatto, N. V., ... & Lenardão, E. J. (2020). Toxicological evaluation of 3-(4-Chlorophenylselanyl)-1-methyl-1H-indole through the bovine oocyte in vitro maturation model. *Toxicology in Vitro*, 62, 104678. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104678>

Peumans, W. J., & Van Damme, E. J. (1995). Lectins as plant defense proteins. *Plant physiology*, 109(2), 347. <https://doi.org/10.1104/pp.109.2.347>

Pinto, L. S., Nagano, C. S., Oliveira, T. M., Moura, T. R., Sampaio, A. H., Debray, H., ... & Cavada, B. S. (2008). Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. *Journal of biosciences*, 33(3), 355-363. <https://doi.org/10.1007/s12038-008-0055-2>

Remião, M. H., Lucas, C. G., Domingues, W. B., Silveira, T., Barther, N. N., Komninou, E. R., ... & Junior, A. S. V. (2016). Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reproductive toxicology*, 63, 70-81. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.05.016>

Russell, D. L., & Salustri, A. (2006, September). Extracellular matrix of the cumulus-oocyte complex. In *Seminars in reproductive medicine* (Vol. 24, No. 04, pp. 217-227). Copyright© 2006 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA. <https://doi.org/10.1055/s-2006-94855>

Russell, W. M. S., & Burch, R. L. (1959). The principles of humane experimental technique. Methuen. <http://hdl.handle.net/10822/762203>

Saeed-Zidane, M., Linden, L., Salilew-Wondim, D., Held, E., Neuhoﬀ, C., Tholen, E., ... & Tesfaye, D. (2017). Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. *PloS one*, 12(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187569>

Shanmugham, L. N., Castellani, M. L., Salini, V., Falasca, K., Vecchiet, J., Conti, P., & Petrarca, C. (2006, September). Relevance of plant lectins in human cell biology and immunology. In *Biology Forum/Rivista di Biologia* (Vol. 99, No. 2). PMID: 17115370

Silva, M. C., Santana, L. A., Mentele, R., Ferreira, R. S., de Miranda, A., Silva-Lucca, R. A., ... & Oliva, M. L. (2012). Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from *Bauhinia forficata* seeds. *Process biochemistry*, 47(7), 1049-1059. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.03.008>

Sohel, M. M. H., Akyuz, B., Konca, Y., Arslan, K., Sariozkan, S., & Cinar, M. U. (2019). Oxidative stress modulates the expression of apoptosis-associated microRNAs in bovine granulosa cells in vitro. *Cell and tissue research*, 376(2), 295-308. <https://doi.org/10.1007/s00441-019-02990-3>

Sovernigo, T. C., Adona, P. R., Monzani, P. S., Guemra, S., Barros, F. D. A., Lopes, F. G., & Leal, C. L. V. (2017). Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. *Reproduction in Domestic Animals*, 52(4), 561-569. <https://doi.org/10.1111/rda.12946>

Supplizi, A. V., Monaci, M., Stradaoli, G., Greve, T., & Parillo, F. (1996). Identification of glycoconjugates in the zona pellucida of in vitro matured and tubal

unfertilized bovine oocytes by lectin histochemistry. *Animal Reproduction Science*, 43(2-3), 99-111. [https://doi.org/10.1016/0378-4320\(96\)01469-8](https://doi.org/10.1016/0378-4320(96)01469-8)

Tanghe, S., Van Soom, A., Duchateau, L., Nauwynck, H., & de Kruif, A. (2004). Carbohydrates and glycoproteins involved in bovine fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*, 68(4), 492-499. <https://doi.org/10.1002/mrd.20095>

Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cellular signalling*, 16(2), 139-144. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2003.08.007>

Tiwari, M., Prasad, S., Tripathi, A. *et al.* Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis* 20, 1019–1025 (2015). <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1136-y>

Tripathi, A., & Chaube, S. K. (2015). Roscovitine induces metaphase-II arrest and apoptosis through FasL-mediated pathway in rat eggs cultured in vitro. *Vitro Cell Dev Biol Anim*, 51(2), 174-82. <https://doi.org/10.1007/s11626-014-9812-8>

Tripathi, A., Khatun, S., Pandey, A. N., Mishra, S. K., Chaube, R., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2009). Intracellular levels of hydrogen peroxide and nitric oxide in oocytes at various stages of meiotic cell cycle and apoptosis. *Free radical research*, 43(3), 287-294. <https://doi.org/10.1080/10715760802695985>

Tripathi, A., Shrivastav, T. G., & Chaube, S. K. (2013). An increase of granulosa cell apoptosis mediates aqueous neem (*Azadirachta indica*) leaf extract-induced oocyte apoptosis in rat. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 3(1), 27. <https://doi.org/10.4103/2229-516X.112238>

Twentyman, P. R., & Luscombe, M. (1987). A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British journal of cancer*, 56(3), 279-285. <https://doi.org/10.1038/bjc.1987.190>

Van Woudenberg, A. B., Gröllers-Mulderij, M., Snel, C., Jeurissen, N., Stierum, R., & Wolterbeek, A. (2012). The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. *Reproductive Toxicology*, 34(2), 251-260. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.05.098>

5 CONCLUSÃO GERAL

Neste estudo, concluímos que a lectina de *B.forficata* não interferiu na taxa de expansão de células do *cumulus*, tampouco na maturação oocitária. Nas análises realizadas utilizando a MIV como modelo de toxicidade, as isoformas recombinantes rBfL e rtBfL não demonstraram ser tóxicas. Entretanto, estimularam a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e à apoptose pela via CASP3. Estudos posteriores utilizando a produção *in vitro* de embriões bovinos deverão ser realizados com o intuito de elucidar os mecanismos apoptóticos estimulados pelas lectinas recombinantes, a fim de aperfeiçoar essas potenciais biomoléculas e gerar insumos biotecnológicos para o desenvolvimento de fármacos.

6 REFERÊNCIAS

- ASSEY, R. J. et al. Oocyte structure and follicular steroid concentrations in superovulated versus unstimulated heifers. **Molecular reproduction and development**, v. 39, n. 1, p. 8-16, 1994
- AGARWAL, Ashok et al. Oxidative stress in an assisted reproductive techniques setting. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 3, p. 503-512, 2006.
- AGARWAL, Ashok; GUPTA, Sajal; SHARMA, Rakesh K. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology**, v. 3, n. 1, p. 28, 2005.
- AITKEN, R. John; CLARKSON, Jane S. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 81, n. 2, p. 459-469, 1987
- AKKOUH, Ouafae et al. Lectins with anti-HIV activity: a review. **Molecules**, v. 20, n. 1, p. 648-668, 2015.
- ALBERTINI, David F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-**, v. 121, n. 5, p. 647-653, 2001.
- AM DE LOOS, F.; ZEINSTRA, E.; M. BEVERS, M. Follicular wall maintains meiotic arrest in bovine oocytes cultured in vitro. **Molecular reproduction and development**, v. 39, n. 2, p. 162-165, 1994.
- ASSEY, R. J. et al. Oocyte morphology in dominant and subordinate follicles. **Molecular reproduction and development**, v. 37, n. 3, p. 335-344, 1994.
- B. MAILHES, John et al. Sensitivity of mouse oocytes to nicotine-induced perturbations during oocyte meiotic maturation and aneuploidy in vivo and in vitro. **Molecular human reproduction**, v. 6, n. 3, p. 232-237, 2000.
- BALL, G. D. et al. Symposium: embryo development and manipulation. Maturation and fertilization of bovine oocytes in vitro. **Journal of dairy science**, v. 67, n. 11, p. 2775-2785, 1984.

- BELVISI, Maria G. et al. Nitric oxide is the endogenous neurotransmitter of bronchodilator nerves in humans. **European journal of pharmacology**, v. 210, n. 2, p. 221-222, 1992.
- BILODEAU-GOESEELS, Sylvie. Effects of manipulating the nitric oxide/cyclic GMP pathway on bovine oocyte meiotic resumption in vitro. **Theriogenology**, v. 68, n. 5, p. 693-701, 2007.
- BLOMME, Eric AG; WILL, Yvonne. Toxicology strategies for drug discovery: present and future. **Chemical research in toxicology**, v. 29, n. 4, p. 473-504, 2015.
- BLONDIN, Patrick; SIRARD, Marc - André. Oocyte and follicular morphology as determining characteristics for developmental competence in bovine oocytes. **Molecular reproduction and development**, v. 41, n. 1, p. 54-62, 1995.
- BOLOTINA, Victoria M. et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, v. 368, n. 6474, p. 850-853, 1994.
- BOTIGELLI, Ramon Cesar et al. Influence of nitric oxide and phosphodiesterases during in vitro maturation of bovine oocytes on meiotic resumption and embryo production. **Zygote**, v. 25, n. 3, p. 321-330, 2017.
- BRACKETT, Benjamin G.; ZUELKE, Kurt A. Analysis of factors involved in the in vitro production of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 39, n. 1, p. 43-64, 1993.
- BU, Shumin et al. Nitric oxide influences the maturation of cumulus cell-enclosed mouse oocytes cultured in spontaneous maturation medium and hypoxanthine-supplemented medium through different signaling pathways. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 223, n. 1-2, p. 85-93, 2004.
- BURTON, Graham J.; JAUNIAUX, Eric. Oxidative stress. **Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287-299, 2011.
- BUSH, Peggy A. et al. Nitric oxide synthase from cerebellum catalyzes the formation of equimolar quantities of nitric oxide and citrulline from L-arginine. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 185, n. 3, p. 960-966, 1992.
- CAMARGO, Luiz Sérgio de Almeida et al. Factors influencing in vitro embryo production. **Anim. Reprod**, v. 3, n. 1, p. 19-28, 2006.

CAMPBELL, B. K. et al. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. **REPRODUCTION-CAMBRIDGE-SUPPLEMENT**-, p. 429-443, 2003.

CHELIKANI, Prashen; FITA, Ignacio; LOEWEN, Peter C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 61, n. 2, p. 192-208, 2004.

CLARK, Judy MacArthur. The 3Rs in research: a contemporary approach to replacement, reduction and refinement. **British Journal of Nutrition**, v. 120, n. s1, p. S1-S7, 2018.

COLONNA, Rosella; MANGIA, Franco. Mechanisms of amino acid uptake in cumulus-enclosed mouse oocytes. **Biology of reproduction**, v. 28, n. 4, p. 797-803, 1983.

CONTI, Marco et al. Role of cyclic nucleotide signaling in oocyte maturation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 187, n. 1-2, p. 153-159, 2002.

DE CARVALHO, Onofre Ferreira et al. Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. 2002.

DE LAMIRANDE, Eve; GAGNON, Claude. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. **Human Reproduction**, v. 10, n. suppl_1, p. 15-21, 1995.

DE VANTÉRY CGavin ACVassalli JD & Schorderet-Slatkine S1996 An accumulation of p34cdc2 at the end of mouse oocyte growth correlates with the acquisition of meiotic competence. **Developmental Biology** 174335–344.

DEKEL, Nava; BEERS, William H. Development of the rat oocyte in vitro: inhibition and induction of maturation in the presence or absence of the cumulus oophorus. **Developmental Biology**, v. 75, n. 2, p. 247-254, 1980.

DELEUZE, Stefan; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of in vitro maturation media: a review. **Reproduction in domestic animals**, v. 45, n. 6, p. e476-e482, 2010.

DONG, Jinwen et al. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature**, v. 383, n. 6600, p. 531, 1996.

E LACERDA, Rodrigo Rodrigues et al. Lectin from seeds of a Brazilian lima bean variety (*Phaseolus lunatus* L. var. cascavel) presents antioxidant, antitumour and gastroprotective activities. **International journal of biological macromolecules**, v. 95, p. 1072-1081, 2017.

ELVIN, Julia A. et al. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular endocrinology**, v. 13, n. 6, p. 1035-1048, 1999.

EPPIG, John J. et al. Murine oocytes suppress expression of luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acid by granulosa cells. **Biology of reproduction**, v. 56, n. 4, p. 976-984, 1997.

EPPIG, John J. Intercommunication between mammalian oocytes and companion somatic cells. **Bioessays**, v. 13, n. 11, p. 569-574, 1991.

EPPIG, John J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001.

EPPIG, John J.; DOWNS, Stephen M. Chemical signals that regulate mammalian oocyte maturation. **Biology of Reproduction**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 1984

ERICKSON GF & Sorensen RA1974 In vitro maturation of mouse oocytes isolated from late middle and pre-antral graafian follicles. **Journal of Experimental Zoology** 190123–127.

FAIR, T. et al. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, v. 68, p. S91-S97, 2007.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T. Bovine oocyte diameter in relation to maturational competence and transcriptional activity. **Molecular reproduction and development**, v. 42, n. 4, p. 437-442, 1995.

FARIA, R. A. P. G. et al. Caracterização química parcial e bioquímica de sementes de *Bauhinia forficata* link. **Arch Latinoam Nutr**, v. 54, p. 349-353, 2004.

FERREIRA, E. M. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-848, 2009.

FOOTE, R. H. The gametogenic function of the aging ovary in the mammal. In: Aging Gametes: Their Biology and Pathology. **Karger Publishers**, 1975. p. 179-200.

FOWLER, Paul A. et al. Ovarian gonadotrophin surge-attenuating factor (GnSAF): where are we after 20 years of research. **Reproduction**, v. 126, n. 6, p. 689-699, 2003.

FRIDOVICH, Irwin. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 97-112, 1995.

GALLOWAY, Susan M. et al. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nature genetics**, v. 25, n. 3, p. 279, 2000.

GEMEINER, P., Mislovicová, D., Tkác, J., Svitel, J., Pätoprstý, V., Hrabárová, E., Kogan, G. and Kozár, T., 2009. Lectinomics II. A highway to biomedical/clinical diagnostics. **Biotechnology advances**, 27(1), p.1.

GENSCHOW, Elke et al. The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 30, n. 2, p. 151-176, 2002.

GILCHRIST, Graham et al. MicroRNA expression during bovine oocyte maturation and fertilization. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 3, p. 396, 2016.

GONÇALVES, Fernanda da Silva et al. Effect of antioxidants during bovine in vitro fertilization procedures on spermatozoa and embryo development. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 1, p. 129-135, 2010.

GONZAGA DO NASCIMENTO-NETO, Luiz et al. Characterization of isoforms of the lectin isolated from the red algae *Bryothamnion seaforthii* and its pro-healing effect. **Marine drugs**, v. 10, n. 9, p. 1936-1954, 2012.

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.

GUTTERIDGE, John MC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-biological interactions**, v. 91, n. 2-3, p. 133-140, 1994.

GUTTERIDGE, John MC. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. **Chemico-biological interactions**, v. 91, n. 2-3, p. 133-140, 1994.

HAGEMANN, L. J. Influence of the dominant follicle on oocytes from subordinate follicles. **Theriogenology**, v. 51, n. 2, p. 449-459, 1999.

HALEY, Sheila A.; WESSEL, Gary M. Regulated proteolysis by cortical granule serine protease 1 at fertilization. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 5, p. 2084-2092, 2004.

HALLIWELL, Barry; GUTTERIDGE, John MC. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, USA, 2015.

HANAFY, Khalid A.; KRUMENACKER, Joshua S.; MURAD, Ferid. NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction. **Med Sci Monit**, v. 7, n. 4, p. 801-19, 2001.

HASHIMOTO, Shu et al. Excessive concentration of glucose during in vitro maturation impairs the developmental competence of bovine oocytes after in vitro fertilization: relevance to intracellular reactive oxygen species and glutathione contents. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 56, n. 4, p. 520-526, 2000.

HAWK, H. W.; WALL, R. J. Improved yields of bovine blastocysts from in vitro-produced oocytes. I. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**, v. 41, n. 8, p. 1571-1583, 1994.

HAZELEGER, N. L.; STUBBINGS, R. B. Developmental potential of selected bovine oocyte cumulus complexes. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 219, 1992.

HEFLER, Lukas A.; GREGG, Anthony R. Inducible and endothelial nitric oxide synthase: genetic background affects ovulation in mice. **Fertility and sterility**, v. 77, n. 1, p. 147-151, 2002.

HIRSHFIELD, Anne Newman. Development of follicles in the mammalian ovary. **International review of cytology**, v. 124, p. 43-101, 1991.

HYTTEL, P.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Ultrastructure of oocyte maturation and fertilization in superovulated cattle. **Progress in clinical and biological research**, v. 296, p. 287-297, 1988.

HYTTEL, Poul et al. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 47, n. 1, p. 23-32, 1997.

HYTTEL, Poul; CALLESEN, Henrik; GREVE, Torben. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. **Journal of reproduction and fertility**, v. 76, n. 2, p. 645-656, 1986.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287-293, 2018.

IMAI, Hirotaka; NAKAGAWA, Yasuhito. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 2, p. 145-169, 2003.

JOANNIDES, Robinson et al. Nitric oxide is responsible for flow-dependent dilatation of human peripheral conduit arteries in vivo. **Circulation**, v. 91, n. 5, p. 1314-1319, 1995.

JONES, Keith T. Turning it on and off: M - phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2004.

KANATSU-SHINOHARA M; Schultz RM & Kopf GS2000 Acquisition of meiotic competence in mouse oocytes: absolute amounts of p34cdc2 cyclin B1 cdc25C and wee1 in meiotically incompetent and competent oocytes. **Biology of Reproduction** 631610–1616.

KEEFER, Carol L.; SCHUETZ, Allen W. Spontaneous activation of ovulated rat oocytes during in vitro culture. **Journal of Experimental Zoology**, v. 224, n. 3, p. 371-377, 1982.

KHAZAEI, Mozafar; AGHAZ, Faranak. Reactive oxygen species generation and use of antioxidants during in vitro maturation of oocytes. **International journal of fertility & sterility**, v. 11, n. 2, p. 63, 2017.

KHURANA, N. K.; NIEMANN, H. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. **Theriogenology**, v. 54, n. 5, p. 741-756, 2000.

KLAFKE, Gabriel Baracy et al. Lectin I from Bauhinia variegata (BVL-I) expressed by Pichia pastoris inhibits initial adhesion of oral bacteria in vitro. **International journal of biological macromolecules**, v. 93, p. 913-918, 2016.

KOMNINO, Eliza Rossi et al. Effects of two types of melatonin-loaded nanocapsules with distinct supramolecular structures: polymeric (NC) and lipid-core nanocapsules (LNC) on bovine embryo culture model. **PloS one**, v. 11, n. 6, 2016.

KOWALTOWSKI, Alicia J.; VERCESI, Anibal E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3-4, p. 463-471, 1999.

KUBELKA, M. et al. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and p - aminobenzamidine block. **Molecular Reproduction and Development**, v. 19, n. 4, p. 423-431, 1988.

LAGARDA-DIAZ, Irlanda; GUZMAN-PARTIDA, Ana Maria; VAZQUEZ-MORENO, Luz. Legume lectins: proteins with diverse applications. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 6, p. 1242, 2017.

LEE, Tsung-Hsien et al. Nitric oxide modulates mitochondrial activity and apoptosis through protein S-nitrosylation for preimplantation embryo development. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 30, n. 8, p. 1063-1072, 2013.

LI, Rong et al. Oocyte-secreted factor (s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 3, p. 839-845, 2000.

LIU, Zhe et al. Animal lectins: potential antitumor therapeutic targets in apoptosis. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 3, p. 629-637, 2012.

- LONERGAN, P.; FAIR, T. Maturation of Oocytes in Vitro. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 4, n. 1, p. 255–268, 2016.
- LOWENSTEIN, Charles J.; DINERMAN, Jay L.; SNYDER, Solomon H. Nitric oxide: a physiologic messenger. **Annals of internal medicine**, v. 120, n. 3, p. 227-237, 1994.
- LUBKOWSKI, Jacek et al. Structural analysis and unique molecular recognition properties of a Bauhinia forficata lectin that inhibits cancer cell growth. **The FEBS journal**, v. 284, n. 3, p. 429-450, 2017.
- LUCAS, Caroline G. et al. High doses of lipid-core nanocapsules do not affect bovine embryonic development in vitro. **Toxicology In Vitro**, v. 45, p. 194-201, 2017.
- MARION, G. B.; GIER, H. T. Ovarian and uterine embryogenesis and morphology of the non-pregnant female mammal. **Journal of animal science**, v. 32, n. Supplement_1, p. 24-47, 1971.
- MARLETTA, Michael A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. **American Society for Biochemistry and Molecular Biology**, 1993.
- MASUI, Yoshio. The elusive cytostatic factor in the animal egg. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 1, n. 3, p. 228-231, 2000.
- MAYES, M. A.; SIRARD, M. A. The influence of cumulus-oocyte complex morphology and meiotic inhibitors on the kinetics of nuclear maturation in cattle. **Theriogenology**, v. 55, n. 4, p. 911-922, 2001.
- MEHLMANN, Lisa M. et al. The Gs-linked receptor GPR3 maintains meiotic arrest in mammalian oocytes. **Science**, v. 306, n. 5703, p. 1947-1950, 2004.
- MEHLMANN, L.M., 2005. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction** 130, 791–799.
- MEIRELLES, F. V. et al. Genome activation and developmental block in bovine embryos. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 13-20, 2004.
- MEMILI, Erdogan; FIRST, Neal L. Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. **Zygote**, v. 8, n. 1, p. 87-96, 2000.

MIYAZAKI, Shunichi; ITO, Masahiko. Calcium signals for egg activation in mammals. **Journal of pharmacological sciences**, v. 100, n. 5, p. 545-552, 2006.

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. **European journal of clinical investigation**, v. 21, n. 4, p. 361-374, 1991.

MURAD, F. The nitric oxide–cyclic GMP signal transduction system for intracellular and intercellular communication. In: Proceedings of the 1992 Laurentian Hormone Conference. **Academic Press**, 1994. p. 239-248.

MYERS, Dayna Kerecman et al. From in vivo to in vitro: The medical device testing paradigm shift. **ALTEX-Alternatives to animal experimentation**, v. 34, n. 4, p. 479-500, 2017.

MYLES, D. G. How does the spermatozoon make its way to the egg and how does fertilization take place. **JOURNAL OF ANDROLOGY**, p. 35-37, 1995.

NAKAMURA, Yasuhiko et al. Nitric oxide inhibits oocyte meiotic maturation. **Biology of reproduction**, v. 67, n. 5, p. 1588-1592, 2002.

NETO, Luiz Gonzaga do Nascimento et al. Effect of the lectin of Bauhinia variegata and its recombinant isoform on surgically induced skin wounds in a murine model. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9298-9315, 2011.

NORRIS, Rachael P. et al. Cyclic GMP from the surrounding somatic cells regulates cyclic AMP and meiosis in the mouse oocyte. **Development**, v. 136, n. 11, p. 1869-1878, 2009.

OLIVEIRA, Carla; TEIXEIRA, José A.; DOMINGUES, Lucília. Recombinant lectins: an array of tailor-made glycan-interaction biosynthetic tools. **Critical reviews in biotechnology**, v. 33, n. 1, p. 66-80, 2013.

PANDEY, Ashutosh N. et al. Reactive oxygen and nitrogen species during meiotic resumption from diplotene arrest in mammalian oocytes. **Journal of cellular biochemistry**, v. 111, n. 3, p. 521-528, 2010.

PEUMANS, Willy J.; VAN DAMME, E. J. Lectins as plant defense proteins. **Plant physiology**, v. 109, n. 2, p. 347, 1995.

PIERCE, Janet D.; CACKLER, Amanda B.; ARNETT, Melinda G. Why should you care about free radicals? Because these molecules appear to play a role in the development of heart disease, cancer, diabetes, and other diseases. Understanding how free radicals form and what you can do to help keep them in balance is essential to maximizing the care you provide now--and in the future. **Rn**, v. 67, n. 1, p. 38-44, 2004.

PINCUS, Gregory; ENZMANN, E. Vr. The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro: I. The activation of ovarian eggs. **Journal of Experimental Medicine**, v. 62, n. 5, p. 665-675, 1935.

PREMKUMAR, Karuppanan V.; CHAUBE, Shail K. Increased level of reactive oxygen species persuades postovulatory aging-mediated spontaneous egg activation in rat eggs cultured in vitro. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 52, n. 5, p. 576-588, 2016.

PRIESTLEY, Joseph. XIX. Observations on different kinds of air. **Philosophical transactions of the royal society of London**, n. 62, p. 147-264, 1772.

RABINOVICH, Gabriel A.; RUBINSTEIN, Natalia; TOSCANO, Marta A. Role of galectins in inflammatory and immunomodulatory processes. **Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1572, n. 2-3, p. 274-284, 2002.

RACOWSKY, Catherine. Effect of forskolin on maintenance of meiotic arrest and stimulation of cumulus expansion, progesterone and cyclic AMP production by pig oocyte—cumulus complexes. **Reproduction**, v. 74, n. 1, p. 9-21, 1985.

RACOWSKY, Catherine; SATTERLIE, Richard A. Metabolic, fluorescent dye and electrical coupling between hamster oocytes and cumulus cells during meiotic maturation in vivo and in vitro. **Developmental biology**, v. 108, n. 1, p. 191-202, 1985.

REIS, Larissa et al. Investigation of cellular proliferative potential of lectin extracted from *Bauhinia variegata* according to different cell lines. In: BMC Proceedings. **BioMed Central**, 2014. p. P265.

REMIÃO, Mariana Härter et al. Melatonin delivery by nanocapsules during in vitro bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. **Reproductive toxicology**, v. 63, p. 70-81, 2016.

RICHARD, François J.; SIRARD, Marc-André. Effects of follicular cells on oocyte maturation. II: Theca cell inhibition of bovine oocyte maturation in vitro. **Biology of Reproduction**, v. 54, n. 1, p. 22-28, 1996.

RUSSELL, William Moy Stratton; BURCH, Rex Leonard. The principles of humane experimental technique. **Methuen**, 1959.

SALUSTRI, A.; SIRACUSA, Go. Metabolic coupling, cumulus expansion and meiotic resumption in mouse cumuli oophori cultured in vitro in the presence of FSH or dcAMP, or stimulated in vivo by hCG. **Reproduction**, v. 68, n. 2, p. 335-341, 1983.

SALUSTRI, A.; YANAGISHITA, Masaki; HASCALL, Vincent C. Synthesis and accumulation of hyaluronic acid and proteoglycans in the mouse cumulus cell-oocyte complex during follicle-stimulating hormone-induced mucification. **Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 23, p. 13840-13847, 1989.

SAUMANDE, J. Ovogenèse et folliculogenèse. **Rec. Méd. Vét.**, v.157, p.29-38. 1981.

SCHULTZ, Richard M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Human Reproduction Update**, v. 8, n. 4, p. 323-331, 2002.

SENGOKU, Kazuo et al. Requirement of nitric oxide for murine oocyte maturation, embryo development, and trophoblast outgrowth in vitro. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 58, n. 3, p. 262-268, 2001.

SHANMUGHAM, L. N. et al. Relevance of plant lectins in human cell biology and immunology. **Rivista di biologia**, v. 99, n. 2, p. 227, 2006.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v. 14, n. 11, p. 53R-62R, 2004.

SHARON, Nathan; LIS, Halina. Legume lectins--a large family of homologous proteins. **The FASEB Journal**, v. 4, n. 14, p. 3198-3208, 1990.

SIES, Helmut. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. **Redox biology**, v. 4, p. 180-183, 2015.

SIES, Helmut. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Experimental physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SIKKA, Suresh C. Andrology lab corner: Role of oxidative stress and antioxidants in andrology and assisted reproductive technology. **Journal of andrology**, v. 25, n. 1, p. 5-18, 2004.

SILVA, Mariana CC et al. Purification, primary structure and potential functions of a novel lectin from Bauhinia forficata seeds. **Process biochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1049-1059, 2012.

SINGH, Ram Sarup; KAUR, Hemant Preet; SINGH, Jatinder. Purification and characterization of a mucin specific mycelial lectin from Aspergillus gorakhpurensis: application for mitogenic and antimicrobial activity. **PloS one**, v. 9, n. 10, 2014.

SIRARD, M. A. et al. Timing of nuclear progression and protein synthesis necessary for meiotic maturation of bovine oocytes. **Biology of reproduction**, v. 40, n. 6, p. 1257-1263, 1989.

SIRARD, M.-A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 483-497, 1998.

SIRARD, Marc-André et al. Contribution of the oocyte to embryo quality. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 126-136, 2006.

SONG, Jia L.; WESSEL, Gary M. How to make an egg: transcriptional regulation in oocytes. **Differentiation**, v. 73, n. 1, p. 1-17, 2005.

SORENSEN RA & Wassarman PM1976 Relationship between growth and meiotic maturation of the mouse oocyte. **Developmental Biology** 50531–536.

SOUZA, Jayra D. et al. A new Bauhinia monandra galactose-specific lectin purified in milligram quantities from secondary roots with antifungal and termiticidal activities. **International biodeterioration & biodegradation**, v. 65, n. 5, p. 696-702, 2011.

STILLMARK, H. Über Ricin ein giftiges Ferment aus den Samen von *Ricinus communis* L. und einige anderen Euphorbiaceen. **Inaugural dissertation Dorpat**, Tartu, 1888.

STREICHER, Hansjörg; SHARON, Nathan. Recombinant plant lectins and their mutants. In: *Methods in enzymology*. **Academic Press**, 2003. p. 47-77.

SUGIURA, Koji et al. Study of germinal vesicle requirement for the normal kinetics of maturation/M-phase-promoting factor activity during porcine oocyte maturation.

Biology of reproduction, v. 74, n. 3, p. 593-600, 2006

SUN, Qing - Yuan. Cellular and molecular mechanisms leading to cortical reaction and polyspermy block in mammalian eggs. **Microscopy research and technique**, v. 61, n. 4, p. 342-348, 2003.

SUTTON, M. L.; GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Effects of in-vivo and in-vitro environments on the metabolism of the cumulus–oocyte complex and its influence on oocyte developmental capacity. **Human reproduction update**, v. 9, n. 1, p. 35-48, 2003.

SUTTON-MCDOWALL, Melanie L.; GILCHRIST, Robert B.; THOMPSON, Jeremy G. The pivotal role of glucose metabolism in determining oocyte developmental competence. **Reproduction**, v. 139, n. 4, p. 685-695, 2010.

TANG, Fuchou et al. Maternal microRNAs are essential for mouse zygotic development. **Genes & development**, v. 21, n. 6, p. 644-648, 2007.

TAO, Yong et al. Immunohistochemical localization of inducible and endothelial nitric oxide synthase in porcine ovaries and effects of NO on antrum formation and oocyte meiotic maturation. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 222, n. 1-2, p. 93-103, 2004.

TEIXEIRA, Edson Holanda et al. Biological applications of plants and algae lectins: an overview. In: *Carbohydrates-Comprehensive Studies on Glycobiology and Glycotechnology*. **IntechOpen**, 2012.

TESFAYE, Dawit et al. Identification and expression profiling of microRNAs during bovine oocyte maturation using heterologous approach. **Molecular reproduction and development**, v. 76, n. 7, p. 665-677, 2009.

TÖRNELL, J.; BILLIG, H.; HILLEN SJÖ, T. Resumption of rat oocyte meiosis is paralleled by a decrease in guanosine 3', 5' - cyclic monophosphate (cGMP) and is inhibited by microinjection of cGMP. **Acta physiologica scandinavica**, v. 139, n. 3, p. 511-517, 1990.

URSINI, Fulvio; MAIORINO, Matilde; GREGOLIN, Carlo. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 839, n. 1, p. 62-70, 1985.

VACCARI, Sergio et al. Cyclic GMP signaling is involved in the luteinizing hormone-dependent meiotic maturation of mouse oocytes. **Biology of reproduction**, v. 81, n. 3, p. 595-604, 2009.

VAN BREEDAM, Wander et al. Sinfonia agridoce: interações glycan-lectina na biologia do vírus. **Revisões da microbiologia do FEMS**, v. 38, n. 4, p. 598-632, 2014.

VAN DAMME, Els JM. History of plant lectin research. In: *Lectins*. Humana Press, **New York, NY**, 2014. p. 3-13.

VAN DAMME, Els JM; LANNOO, Nausicaa; PEUMANS, Willy J. Plant lectins. In: *Advances in botanical research*. **Academic Press**, 2008. p. 107-209.

VAN WOUDEMBERG, Anna Beker et al. The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. **Reproductive Toxicology**, v. 34, n. 2, p. 251-260, 2012.

VIGNEAULT, Christian et al. Transcription factor expression patterns in bovine in vitro-derived embryos prior to maternal-zygotic transition. **Biology of reproduction**, v. 70, n. 6, p. 1701-1709, 2004.

WATKINS, Winifred M.; MORGAN, W. T. J. Neutralization of the anti-H agglutinin in eel serum by simple sugars. **Nature**, v. 169, n. 4307, p. 825-826, 1952.

WENDEL, Albrecht. [44] Glutathione peroxidase. In: *Methods in enzymology*. **Academic Press**, 1981. p. 325-333.

ZUELKE, Kurt A.; BRACKETT, Benjamin G. Increased glutamine metabolism in bovine cumulus cell-enclosed and denuded oocytes after in vitro maturation with luteinizing hormone. **Biology of reproduction**, v. 48, n. 4, p. 815-820, 1993.