



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA – *CAMPUS* DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGb

BIANCA RÉGIA SILVA

**EFEITOS DA FRUTALINA (LECTINA DA FRUTA PÃO - *ARTOCARPUS*
INCISA) DURANTE A MATUREZAÇÃO E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE
OÓCITOS SUÍNOS**

SOBRAL-CE

2018

BIANCA RÉGIA SILVA

**EFEITOS DA FRUTALINA (LECTINA DA FRUTA PÃO - *Artocarpus incisa*)
DURANTE A MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS
SUÍNOS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Macromoléculas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva

SOBRAL – CEARÁ

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S578e Silva, Bianca Régia.
Efeitos da frutalina (lectina da fruta pão - *Artocarpus incisa*) durante a maturação e fertilização in vitro de oócitos suínos : Efeitos da frutalina em oócitos suínos / Bianca Régia Silva. – 2018.
74 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2018.
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco Léo Nascimento de Aguiar.
1. *Artocarpus incisa*. 2. fertilização in vitro. 3. frutalina. 4. maturação in vitro. I. Título.
- CDD 660.6
-

BIANCA RÉGIA SILVA

**EFEITOS DA FRUTALINA (LECTINA DA FRUTA PÃO - *Artocarpus incisa*)
DURANTE A MATURAÇÃO E FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS
SUÍNOS**

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva – (Orientador)
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

Dr. Francisco Léo Nascimento de Aguiar
(Universidade Estadual do Ceará – UECE)

Prof. Dr. André Luis Coelho da Silva
(Universidade Federal do Ceará – UFC)

*Á Deus, por todas as graças concedidas.
Aos meus pais, Andréa e Arimateia, pelo amor e apoio.
Ao meu noivo, Adylson, pelo amor, companherismo e dedicação.
Á minha irmã, Rafaela, pelo carinho e fraternidade.
Aos meus familiares e amigos.*

Com amor, dedico.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, por me dar força, paciência e sabedoria para enfrentar os desafios. Sou grata pelo cuidado diário e por todas as bênçãos alcançadas na vida familiar, pessoal e profissional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, pelo incentivo, dedicada orientação e principalmente, pelos ensinamentos valorosos de honestidade e responsabilidade.

Ao professor Dr. Ricardo Figueiredo e toda sua equipe do Laboratório de Manipulação de Óocitos e Folículos Ovarianos Pré-Antrais (LAMOFOPA), pelo acolhimento e colaboração para a realização deste trabalho.

Á professora Dra. Carolina Maside, pelos ensinamentos e principalmente, por sua generosidade em ajudar-me em todas as fases deste trabalho.

Aos professores Dr. André Coelho e Dr. Francisco Léo Nascimento de Aguiar, pelo apoio e contribuição valorosa para a realização deste estudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFC, pelos ensinamentos durante o curso.

Aos meus pais, Andréa e Arimateia, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos da minha vida.

Á minha irmã Rafaela, por quem tenho uma grande afeição, pelo enorme coração que tem. Obrigada por sempre me apoiar e acreditar na minha capacidade.

Ao meu noivo Adylson, pelo apoio, carinho, conselhos e por proporcionar-me alguns dos momentos mais felizes da minha vida. Te amo!

Á minha amiga Cássia, pelo apoio, amizade e ajuda na realização deste trabalho. Obrigada pelas palavras de conforto, e por sempre torcer e ficar feliz com as minhas conquistas.

Á toda equipe do grupo de pesquisa em Biotecnologia da Reprodução e Cultura de Células e Tecidos (UFC), Laís Melo, Pedro, Edilcarlos, Bruno Matos, Carlos Henrique, Taiã Gomes, Miguel Fernandes, Laryssa e Dandara.

Aos amigos Glaucinete Borges, Gisvani Lopes, Ellen Vasconcelos e Anderson Weiny, pelos momentos de aprendizado e alegria que passamos juntos no laboratório. Obrigada pela disponibilidade de sempre ajudar, pelo incentivo, apoio e carinho.

Aos meus colegas de mestrado, Débora, Nayara, Bruno, Ciro, Victor, Carlos, Heloísa, Carol, Fábio, Eloi, Rômulo, Rafael e Jéssyca, pelos conhecimentos compartilhados e momentos de descontração durante o curso.

Á Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a concretização de minhas atividades de pesquisa.

Á Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UFC, pela oportunidade oferecida.

Agradeço também a todos os funcionários da UFC, em especial ao Sr. Almino, Edilda Ponte, Gade Sousa e Maria José, pelo carinho.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da frutalina (FTL) durante a maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos suínos. No experimento 1, os complexos cumulus-oócitos (COCs) foram submetidos a MIV em meio TCM-199+ sozinho ou suplementado com FTL (0,6; 6 e 60 µg/mL), ou doxorubicina 0,3 µg/mL (DXR). Após a MIV, parte dos oócitos foram avaliados quanto à configuração da cromatina e os oócitos remanescentes foram submetidos a FIV. No experimento 2, os COCs foram maturados em meio livre de FTL e, em seguida, foram fertilizados em meio suplementado com FTL (0,6; 6 e 60 µg/mL), ou doxorubicina 0,3 µg/mL de DXR. Após 18 h de fertilização, foram avaliadas as taxas de penetração, monospermia, espermatozoides/oócito e a eficiência da FIV em ambos os experimentos. No experimento 1, as concentrações de 6 e 60 µg/mL de FTL, bem como a DXR aumentaram ($P < 0,05$) as taxas de oócitos com configuração de cromatina anormal quando comparado aos oócitos maturados em meio controle sozinho ou suplementado com 0,6 µg/mL de FTL. A porcentagem de retomada meiótica nos oócitos maturados com 60 µg/mL de FTL ou DXR foram menores ($P < 0,05$) do que nos demais tratamentos. Adicionalmente, os oócitos maturados com 6, 60 µg/mL de FTL ou DXR tiveram menor eficiência de MIV quando comparados com os grupos 0,6 µg/mL de FTL ou meio controle. A exposição dos COCs durante a MIV com 6 ou 60 µg/mL de FTL reduziu ($P < 0,05$) as taxas de penetração de espermatozoides/oócito quando comparadas aos outros tratamentos, mas a eficiência da FIV foi menor ($P < 0,05$) do que a obtida no controle ou com 0,6 µg/mL de FTL. No experimento 2, a suplementação de 6,0 ou 60 µg/mL de FTL ($P < 0,05$) reduziu as taxas de oócitos penetrados e de espermatozoides/oócito, mas aumentou ($P < 0,05$) as taxas de monospermia. A utilização 0,6 µg/mL de FTL aumentou ($P < 0,05$) as taxas de monospermia e eficiência da FIV, quando comparado ao meio de controle. Além disso, 6 e 60 µg/mL de FTL reduziu as taxas de penetração ($P < 0,05$), as taxas de espermatozoides/oócitos e a eficiência da FIV. Em conclusão, 0,6 µg/mL de FTL reduz as taxas de penetração e o número de espermatozoides/oócitos aumentando a eficiência da FIV sem efeitos nocivos. Por outro lado, a utilização de 6,0 e 60 µg/mL de FTL causa efeitos tóxicos durante a maturação dos oócitos e reduz as taxas de eficiência de FIV.

Palavras-chave: *Artocarpus incisa*, fertilização *in vitro*, frutalina, maturação *in vitro*.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of frutalin (FTL) on *in vitro* maturation (IVM), and fertilization (IVF) of porcine oocytes. In the experiment 1, cumulus-oocyte complexes (COCs) were submitted to IVM in maturation medium alone or supplemented with different FTL concentrations (0.6, 6 and 60 µg/mL), or 0.3 µg/mL doxorubicin (DXR). After IVM, some oocytes were evaluated for chromatin configuration, and the remaining oocytes were submitted to *in vitro* fertilization. In experiment 2, matured oocytes were fertilized in IVF medium alone (control) or in presence of different FTL concentrations (0.6, 6 and 60 µg/mL), or 0.3 µg/mL DXR. After 18 h post fertilization, the endpoints penetration rate, monospermy, spermatozoa per oocyte, and the IVF efficiency were evaluated in both experiments. In experiment 1, 6 and 60 µg/mL FTL, as well as DXR increased ($P < 0.05$) the rate of oocytes with abnormal chromatin configuration when compared to oocyte matured in control medium alone or supplemented with 0.6 µg/mL FTL. The percentage of meiotic resumption in oocytes cultured with 60 µg/mL FTL or DXR were lower ($P < 0.05$) than in the other treatments. Moreover, oocytes matured with 6 and 60 µg/mL FTL and DXR showed lower IVM efficiency when compared to those matured with 0.6 µg/mL FTL or in control medium. Exposure of COCs during IVM to 6 or 60 FTL reduced ($P < 0.05$) penetration and sperm/oocyte rates when compared to other treatments, but IVF efficiency was lower ($P < 0.05$) than that in control medium alone or with 0.6 µg/mL FTL. In experiment 2, 0.6 µg/mL FTL increased ($P < 0.05$) monospermy and IVF efficiency rates when compared to control medium. In addition, 6 and 60 µg/mL FTL reduced ($P < 0.05$) penetration, sperm/oocyte rates and IVF efficiency, although increasing ($P < 0.05$) monospermy rates. In conclusion, 0.6 µg/mL FTL reduces the penetration rates and the number of sperm/oocytes increasing IVF efficiency without harmful effects. Higher concentrations of FTL have toxic effects during oocyte maturation and reduced IVF efficiency.

Keywords: *Artocarpus incisa*, *in vitro* fertilization, frutalin, *in vitro* maturation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Classificação estrutural das lectinas vegetais. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e 24 superlectinas

ARTIGO I

FIGURE 1. Crystallographic structure of the frutalin lectin showing the presence of four monomers 35

FIGURE 2. Representation of the interaction between lectin-carbohydrate on the cell surface. 37

ARTIGO II

FIGURE 1. Characteristics of oocyte chromatin configuration after 44 h of *in vitro* maturation. A) oocyte matured in control medium with normal chromatin; B) oocyte with abnormal chromatin after maturation in presence of 60 $\mu\text{g/mL}$ frutalin; C) oocyte with abnormal chromatin after culturing in a medium that contained doxorubicin 60

LISTA DE TABELAS

ARTIGO II

TABLE 1.	Variables of IVM in pig COCs cultured in media for 44 h with different concentrations of FTL and DXR during IVM	58
TABLE 2.	Variables of IVF in pig oocytes cultured in media with different concentrations of FTL and DXR during <i>in vitro</i> maturation after 18 of h post-insemination	59
TABLE 3.	Variables of IVF in <i>in vitro</i> matured oocytes that were cultured in a medium with different concentrations of FTL and DXR during IVF after 18 h post-insemination	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Akt	Proteína kinase
ATP	Adensina trifosfato
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
BMP-15	Proteína morfogenética óssea-15
BSA	Albumina sérica bovina
Con A	Concanavalina A
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EGF	Fator de crescimento epidermal
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
FSH-R	Receptor de hormônio folículo estimulante
FTL	Frutalina
GDF-9	Fator de crescimento e diferenciação -9
IGF-1	Fator de crescimento semelhante à insulina
IL	Interleucina
IL-1RI	Receptor de interleucina do tipo I
IL-1RII	Receptor de interleucina do tipo II
KL	Kit ligante
LH	Hormônio luteinizante
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPF	Fator promotos da meiose
MPGF	Pronúcleo masculino
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
Ng	Nanograma
NO	Óxido nítrico
p27	Inibidor de kinase dependente de ciclina
P4	Progesterona
PBS	Tampão fosfato salino
PHA	Fitoheglutinina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
Ph	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinase
PKA	Proteína quinase A
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
VG	Vesícula germinativa
ZP	Zona pelúcida
α -MEM	Meio essencial mínimo alfa
α -MEM ⁺	Meio essencial mínimo alfa suplementado

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
± SEM	Standard error of the mean (Erro padrão da média)
≥	Maior ou igual a
≤	Menor ou igual a
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
M	Molar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Dinâmica do crescimento folicular em suínos.....	16
2.2	Características do oócito e da maturação oocitária.....	17
2.2.1	<i>Maturação oocitária nuclear.....</i>	19
2.2.2	<i>Maturação oocitária citoplasmática.....</i>	20
2.3	Fertilização <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	21
2.4	Características das lectinas e seus efeitos durante o crescimento folicular, maturação oocitária e fertilização.....	24
2.4.1	<i>Lectinas Vegetais.....</i>	24
2.4.2	<i>Influência das lectinas na maturação oocitária e fertilização in vitro.....</i>	25
2.5	Efeitos da Frutalina (Lectina das sementes de <i>Artocarpus incisa</i> L.) <i>in vitro</i>	27
3	JUSTIFICATIVA.....	28
4	HIPÓTESES.....	29
5	OBJETIVOS.....	30
5.1	Objetivo geral.....	30
5.2	Objetivos específicos.....	30
6	CAPÍTULO 1 Structural characteristics of biotechnological applications of frutalin: lectin extracted from <i>Artocarpus incisa</i>	31
7	CAPÍTULO 2 Dose-dependent effects of frutalin on <i>in vitro</i> maturation and fertilization of porcine oocytes.....	43
8	CONCLUSÕES GERAIS.....	61
9	PESPECTIVAS.....	62
10	REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

As lectinas representam uma família de proteínas que possuem pelo menos um domínio não catalítico, as quais são capazes de reconhecer e se ligar de forma específica e reversível a carboidratos (mono ou oligossacarídeos) e glicoconjugados em superfície celular (PEUMANS; VAN DAMME, 1995). Dentre as lectinas, destaca-se a frutalina, uma lectina extraída da fruta-pão (*Artocarpus incisa*) que possui afinidade de ligação por D-galactose. Devido as suas características de ligação, várias atividades biológicas já foram reportadas para a frutalina, como efeitos nociceptivos agudos e neuropáticos (DAMASCENO *et al.*, 2016), indução de migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo* (BRANDO-LIMA *et al.*, 2005), indução de quimiotaxia e reorganização do citoesqueleto de neutrófilos humanos, atuação na motilidade celular e na resposta oxidativa (ROCHE *et al.*, 2006). Além disso, a frutalina possui potencial para reconhecer e diferenciar células cancerígenas da próstata, tireoide, mama e linfoma de Hodgkin (OLIVEIRA *et al.*, 2009; FERREIRA, 2001; CONSTÂNCIO, 2005; MILHOME, 2008). Em relato anterior, Oliveira *et al.* (2011) estudando a ação da frutalina em linhagens de células HeLa, observaram que ela também possui efeito citotóxico, sendo capaz de causar a apoptose destas células. No entanto, muitas drogas usadas para tratar câncer, como a doxorrubicina (DXR), podem comprometer a integridade dos oócitos, impedindo que ocorra a maturação eficiente e conseqüentemente, prejudicando a fertilização.

Recentemente, Soares *et al.* (2018) mostraram aumento na expressão de genes pró-apoptóticos e um efeito prejudicial na morfologia folicular quando foram adicionadas concentrações superiores a 50 µg/mL de frutalina durante o cultivo *in vitro* de tecido cortical ovariano caprino. Mesmo com esses estudos, é desconhecido a influência da frutalina no processo de maturação oocitária e fertilização em mamíferos. Sabe-se que a integridade oocitária é um fator determinante para que o oócito possa atingir a maturação, fertilização ou ativação partenogenética (ROTH; HANSEN, 2005). Durante a fertilização, as proteínas da membrana espermática reconhecem os carboidratos localizados na zona pelúcida (ZP), que é um passo crucial para a penetração (BEN-YOSEF; SHALGI, 2001). Nos suínos, esta interação proteína-carboidratos ocorre através da manose e galactose (YONEZAWA *et al.*, 2005). Desta forma, acredita-se que a frutalina teria a capacidade de se unir a esses carboidratos na ZP e bloquear a penetração

de espermatozoides durante a fertilização em mamíferos, incluindo suínos. A espécie suína é considerada um modelo animal adequado para humanos, devido as semelhanças de diâmetro do oócito, duração da maturação oocitária e desenvolvimento embrionário (SANTOS *et al.*, 2014). Além disso, a vantagem de usar ovários suínos é que são obtidos de animais com raça e idade semelhantes e possuindo nutrição controlada. Assim, a espécie suína tem sido bastante utilizada como modelo para oócitos humanos em testes de toxicidade (SANTOS *et al.*, 2014). A avaliação da toxicidade reprodutiva de substâncias sintéticas ou naturais podem ser realizadas *in vivo* e/ou *in vitro*. No entanto, os estudos *in vitro* permitem testar a toxicidade de drogas evitando as preocupações éticas e restrições de experiências *in vivo*. Desta forma, uma alternativa para testes toxicológicos reprodutivos, consiste na utilização de biotécnicas reprodutivas como a maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) (FIGUEIREDO *et al.*, 2011).

Para um maior esclarecimento da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir irá abordar aspectos relacionados à dinâmica do crescimento folicular, maturação oocitária, maturação nuclear, maturação citoplasmática, fertilização *in vitro* e a influência das lectinas durante o crescimento oocitário, com enfoque para a lectina frutalina e seus mecanismos de ação.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dinâmica do crescimento folicular em suínos

A fêmea suína é poliéstrica durante todo o ano, sendo a ciclicidade interrompida somente em uma gestação ou disfunção endócrina (ANDERSON, 1995). Em fêmeas pré-púberes, cíclicas, gestantes e desmamadas, os grupos de folículos primordiais são continuamente ativados e iniciam o desenvolvimento. O crescimento até a formação do antro é muito lento. Durante o período estral, a população de folículos antrais superficiais aumenta seu crescimento e cerca de 40 a 50% dos folículos antrais de tamanho médio morrem por atresia entre o 16º dia de estro (COX, 1990). Após este período, os folículos dominantes continuam o crescimento em direção ao estágio de folículos pré-ovulatórios.

O crescimento final, ou seja, de folículos de 1-4 mm até folículos pré-ovulatório (6 a 10 mm) é muito rápido e requer cerca de quatro a seis dias, com uma proliferação seguida de aumento no volume do antro, diferenciação das células foliculares e aumento na secreção de inibina e estradiol, bem como do aparecimento de receptores do hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa (PRUNIER; QUESNEL, 2000). No decorrer do desenvolvimento de folículos antrais, o oócito secreta fatores que estimulam a proliferação e a diferenciação das células da granulosa de suínos, promovendo a supressão da produção de progesterona, o que impede a luteinização prematura (HUNTER; PARDIS, 2009).

Estudos revelam que o crescimento de folículos antrais até 2-3 mm não requer suporte gonadotrófico, pois inicialmente é controlado por fatores de crescimento produzidos localmente nos ovários. Após a luteólise ou desmame, cerca de 15 a 25 folículos antrais saudáveis com diâmetro de 1-4 mm são recrutados, selecionados e crescem até o estágio de folículos pré-ovulatórios. Em seguida, após quatro a sete dias, é observada a ovulação dos folículos sobreviventes. Tem sido sugerido que, em fêmeas cíclicas, o declínio da progesterona após luteólise é o sinal para o recrutamento e a seleção folicular. Contudo, experimentos na ausência de gonadotrofinas têm demonstrado que o hormônio folículo estimulante (FSH) é necessário para suportar o crescimento folicular acima de 2-3 mm e LH acima de 4 mm (PRUNIER; QUESNEL, 2000).

2.2 Características do oócito e da maturação oocitária

Os oócitos são derivados das células germinativas primordiais, as quais se desenvolvem antes do nascimento (DEW, 2001). Em seus primeiros estágios de desenvolvimento os oócitos são circundados por uma camada de células somáticas pavimentosas, denominadas células da pré-granulosa (PICTON, 1998). Durante o período embrionário, o oócito passa por uma série de divisões mitóticas, até o início da divisão meiótica, na qual o oócito entrará em parada meiótica no estágio de prófase I, onde se manterá até o seu completo desenvolvimento, aumentando seu tamanho e conteúdo citoplasmático incluso no ambiente folicular (BLANCO *et al.*, 2011). Após seu pleno desenvolvimento folicular, dá-se início ao evento denominado maturação oocitária.

A maturação oocitária em mamíferos é caracterizada pela sequência de eventos nucleares e citoplasmáticos que ocorrem desde o estágio de vesícula germinativa (VG) até o término da segunda divisão meiótica, com formação do segundo corpúsculo polar após a fertilização (BLANCO *et al.*, 2011). No período que compreende a onda de LH e a ovulação, o oócito passa por uma série de mudanças nucleares e citoplasmáticas concomitantes ao seu crescimento (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). De acordo com a retomada ou não da meiose, os oócitos podem ser classificados como competentes ou incompetentes, respectivamente (ARLOTTO *et al.*, 1996). Oócitos competentes são aqueles que, por definição, têm a capacidade para concluir a meiose, para se dividir após fertilização, se desenvolver na forma de embrião até ao estágio de blastocisto, originar uma gravidez e por fim originar um ser saudável (TORNER *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2009). A competência meiótica é obtida durante a foliculogênese e acontece *in vivo* somente em oócitos de folículos dominantes (pré-ovulatórios) totalmente crescidos (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012).

Para que a maturação oocitária ocorra de forma apropriada, é fundamental que além das modificações no núcleo (maturação nuclear), outros processos estejam acontecendo dentro do citoplasma do oócito (maturação citoplasmática), os quais requerem um desenvolvimento completo para que ocorra a fertilização apropriadamente. Oócitos que não completam adequadamente a sua maturação citoplasmática são incapazes de completar os processos normais do desenvolvimento oocitário (KRISHER *et al.*, 2004). Assim, embora independentes, as maturações nuclear e citoplasmática interagem e, *in vivo*, ocorrem de maneira sincronizada em determinados períodos,

garantindo a plena capacitação do oócito (FERREIRA *et al.*, 2009; YAMADA; ISAJI, 2011).

In vivo, a retomada da meiose tem início sob a influência da onda pré-ovulatória de LH, a qual acontece somente em oócitos meioticamente competentes provenientes de folículos dominantes. O oócito é circundado pelas células compactas do cúmulus antes e no momento da onda de LH. No momento que precede a onda de LH, as junções *gap* existentes entre as células do cúmulus e o oócito se desfazem (SÁNCHEZ; SMITZ, 2012). A inibição da secreção de LH ou a inativação dos receptores de LH previne a maturação oocitária e promove falha na ovulação do oócito. Uma vez que nenhum receptor de LH é detectado nos oócitos, os sinais que desencadeiam a maturação oocitária são oriundos das células foliculares que o circundam (PENG *et al.*, 1991; VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Os folículos reagem ao pico de LH, mudando a produção de esteroides pelas células da granulosa e produzindo ácido hialurônico pelas células do cúmulus. O ácido hialurônico produzido leva à mucificação e expansão das células do cúmulus, bem como ao rompimento das junções comunicantes existentes entre estas células e o oócito (PICTON *et al.*, 1998). Assim, as células do cúmulus apoiam uma variedade de funções durante a maturação do oócito, como metabolismo, retomada da meiose e rearranjos citoesqueléticos. Adicionalmente, influenciam os níveis de ATP nos oócitos durante a maturação, por intermédio da comunicação célula-célula via junções *gap* (COTICCHIO *et al.*, 2015).

In vitro, nos casos em que os oócitos são prematuramente removidos de seus folículos, ocorre a retomada da meiose espontaneamente através de um mecanismo diferente do que ocorre *in vivo*. Quando os oócitos são removidos de seus folículos, eles sofrem uma rápida diminuição nos seus níveis de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). Esta diminuição leva imediatamente à ativação do fator promotor da maturação, ocasionando automaticamente a retomada da meiose (THOMAS *et al.*, 2004). Apesar de várias décadas de pesquisa, quando oócitos são derivados da MIV na maioria das espécies, estes possuem um resultado de desenvolvimento inferior quando comparados aqueles derivados após a maturação *in vivo*, mesmo com avanços recentes (WALLS *et al.*, 2015).

2.2.1 Maturação oocitária nuclear

A maturação oocitária nuclear é caracterizada pela habilidade do oócito em retomar a meiose até o estágio de metáfase II, podendo ser observada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar (WATSON, 2007; BLANCO *et al.*, 2011). O processo de maturação do oócito é regido em resposta ao pico de LH que envolve várias vias regulatórias, tais como a alteração da fosforilação de proteínas, nos níveis de cAMP e nos níveis de cálcio intra-citoplasmáticos (HOMA, 1995; GORDO *et al.*, 2001; MEHLMANN, 2005).

Segundo Wehrend e Meinecke (2001), a retomada da meiose e o processo de maturação nuclear são regulados pela fosforilação e desfosforilação proteica, por meio de proteínas quinases e fosfatases, respectivamente. Gordo (2001) demonstrou que a proteína denominada fator promotor da maturação (MPF) é a responsável pelo início da maturação oocitária, uma vez que a sua ativação precede ou ocorre simultaneamente à quebra da vesícula germinativa (RVG). A ativação do MPF promove a fosforilação de proteínas que dão origem ao envelope nuclear e àquelas envolvidas com a condensação da cromatina e reorganização do citoesqueleto (TROUNSON *et al.*, 2001). Também estão envolvidas no processo de maturação oocitária as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que quando ativadas, promovem a ativação e estabilização do fator promotor da maturação (MPF) nos oócitos, pela inibição de alguns reguladores negativos deste fator e pela ativação da enzima cdc25 fosfatase (SAGATA, 1997).

O aumento dos níveis de cAMP no oócito de mamíferos é de grande relevância para a maturação nuclear, já que sua atividade promove a fosforilação e desfosforilação de proteínas específicas envolvidas no bloqueio e reinício meiótico (CONTI *et al.*, 1998). Estudos demonstram que as gonadotrofinas promovem elevação da concentração de cAMP, resultando na expressão de substâncias indutoras da RVG e na expansão das células do cumulus (SU, 2003). Segundo Byscov *et al.* (1997), a perda da comunicação entre os complexos cúmulos oócitos (COCs) e as células foliculares, em consequência ao estímulo hormonal ou da remoção dos COCs do ambiente folicular, interrompe a transferência de moléculas inibitórias e cAMP para os oócitos, e assim, há uma redução na concentração intraoocitária de cAMP. A elevação de gonadotrofinas como o LH, não só ativa a adenilato ciclase, para promover um aumento do cAMP, mas também estimula um rápido aumento do cálcio intracelular nas células do cúmulus pela ativação da

fosfolipase C. Nos animais domésticos, o pico de LH induz sinais de alta frequência de cálcio nos oócitos, a síntese de ciclinas e, possivelmente, de outras proteínas do ciclo celular. É proposto que a modificação das ciclinas pelo sinal de cálcio é necessária para a ativação completa do MPF na presença de quinases dependes de ciclina, resultando na quebra da vesícula germinativa (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

2.2.2 *Maturação oocitária citoplasmática*

A maturação oocitária dos gametas femininos não se resume apenas as alterações cromossômicas durante a maturação nuclear, mas vem acompanhada da maturação citoplasmática do oócito que inclui diversas transformações no ooplasma, como a capacidade do oócito em bloquear a polispermia, promover a descondensação do espermatozoide já no interior do ooplasma, formar o pronúcleo após a fertilização, e sustentar as fases iniciais do desenvolvimento embrionário (FERREIRA *et al.*, 2009; LIU *et al.*, 2010; MAO *et al.*, 2014). Esse processo inclui modificações estruturais no oócito, caracterizadas pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, dinâmica dos filamentos do citoesqueleto, e a maturação molecular (BLANCO *et al.*, 2011, VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; CROCOMO, 2015).

A maturação molecular envolve a produção e o armazenamento de proteínas e de RNAs, essenciais para a recomposição genômica, ativação e envios de mensagens indispensáveis para regulamentação da embriogênese. Assim, o oócito é o principal responsável por assegurar o desenvolvimento embrionário inicial, principalmente devido à presença de grande quantidade de RNAs mensageiros e proteínas que foram acumulados durante crescimento do oócito (FAIR *et al.*, 2007, HAMATANI *et al.*, 2008). Biase *et al.* (2012) demonstraram que o potencial de desenvolvimento embrionário e a qualidade dos blastocistos são determinados pela adequada concentração oocitária de RNAs mensageiros. Os RNAs mensageiros estocados são traduzidos durante a maturação do oócito, quando a célula entra em divisão meiótica e durante embriogênese inicial. Vários RNAs mensageiros estocados têm caudas poli (A) curtas e quando estas caudas são posteriormente alongadas, inicia-se a tradução.

Muitas organelas são redistribuídas durante o processo de maturação citoplasmática. As mitocôndrias, através de fosforilação oxidativa do metabolismo dos carboidratos e dos ácidos graxos do citoplasma, são as responsáveis pela produção de

grande parte da energia celular em forma de ATP. Além disso, estas organelas participam dos processos de apoptose e manutenção da homeostase do cálcio (MAO *et al.*, 2014). Em bovinos, os oócitos na fase de VG, as mitocôndrias encontram-se na zona cortical do citoplasma, enquanto que em oócitos em metáfase I e II, estas são muito mais numerosas e encontram-se distribuídas por todo o citoplasma (LIU *et al.*, 2010; KATSKA *et al.*, 2011; MAO *et al.*, 2014).

Os grânulos corticais presentes no ooplasma são constituídos por proteases, glicosidases, enzimas e proteínas estruturais, que contribuem na modificação da zona pelúcida, oferecendo uma barreira física e bioquímica para o bloqueio da polispermia. Os grânulos corticais são encontrados inicialmente em pequenos grupos no citoplasma dos oócitos em estágio de VG. Com o avanço da maturação, sua migração ocorre para a periferia do oócito (FERREIRA *et al.*, 2009).

É importante ressaltar que neste processo também estão envolvidas proteínas como o fator de crescimento do pronúcleo masculino (MPGF) e o promotor de crescimento da maturação (MPF). As proteínas do citoesqueleto e a correta distribuição das organelas são importantes para a maturação citoplasmática e podem afetar a competência do oócito (BREVINI *et al.*, 2007).

2.3 Fertilização *in vivo* e *in vitro*

Denomina-se fertilização a fusão entre o gameta feminino e o masculino que dará origem a um zigoto, apto para gerar um novo organismo multicelular. Nos mamíferos este processo é caracterizado por três eventos. A passagem espermática entre as células do cumulus, a fixação espermática na zona pelúcida e a fusão do espermatozoide a membrana plasmática do oócito. Em seguida, ocorre a exocitose dos grânulos corticais e a retomada da meiose com extrusão do segundo corpúsculo polar e formação do pronúcleo feminino. O núcleo espermático se descondensa gerando um pronúcleo masculino (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Os pronúcleos masculino e feminino migram para o centro do oócito, onde ocorre a degradação do envelope nuclear e a associação dos cromossomos para a primeira divisão mitótica, denominada clivagem, dando início ao desenvolvimento embrionário (GONÇALVES *et al.*, 2002; DURANTTHON *et al.*, 2008).

Na fertilização *in vivo*, é necessário que o espermatozoide percorra um longo trajeto pelo trato genital da fêmea até chegar ao sítio de fertilização no oviduto para que ocorra a fecundação. No decorrer deste percurso, glicosaminoglicanos existentes no trato reprodutivo feminino induzem sua capacitação (HAFEZ; HAFEZ, 2004). *In vitro*, assim como *in vivo*, o processo de fecundação do oócito envolve uma cascata bioquímica complexa, que se inicia com o aumento da motilidade do espermatozoide, que deve sofrer capacitação, reconhecimento de receptores na zona pelúcida do oócito, sofrer reação acrossômica, ligar-se na membrana plasmática do oócito e, por fim, incorporar-se ao citoplasma (DODE; RODOVALHO, 2002).

A capacitação espermática está relacionada com uma remoção gradual e alteração de glicoproteínas periféricas, redução nos níveis de colesterol e mudanças na distribuição e composição de certos fosfolipídeos de membrana. Para a capacitação espermática *in vitro* de suínos, é comumente utilizada a cafeína (ROMAR *et al.*, 2016). O espermatozoide capacitado e com o acrossoma intacto consegue atravessar pelas células do cumulus, porém não passa pela zona pelúcida do oócito. Por esse motivo, Gordon (1994) relatou que a reação acrossômica é imprescindível para a passagem do gameta masculino pela ZP.

A ZP do oócito de mamíferos é composta por três glicoproteínas, denominadas ZP1, ZP2 e ZP3, que interagem por ligações não covalentes. Cada um dos tipos de glicoproteínas consiste de uma cadeia comum de polipeptídeo, que é heterogeneamente glicosilado com o oligossacarídeo ligado a aspargina-(N) que se liga a serina/treonina-(O) (GUPTA *et al.*, 2004). A ligação primária do espermatozoide com a zona pelúcida acontece por meio da proteína ZP3, enquanto que a ZP2 participa da ligação espermática secundária na ZP. A ligação espermática primária por meio da ZP3 ocorre em locais específicos. Estas regiões possuem resíduos glicosilados de serina (Ser) para que o espermatozoide, com acrossoma intacto, possa se ligar durante a fecundação. Evidências sugerem que vários açúcares incluindo galactose, fucose e glucosamina-acetil-N, podem estar envolvidos no reconhecimento pelo espermatozoide (GUPTA *et al.*, 2004). Estudos demonstraram que as glicoproteínas ZPB (pZP3 α) e ZPC (pZP3 β) são o local de ligação ao esperma na membrana de oócitos suínos, revelando que os resíduos de galactose terminais atuam como os locais de ligação do esperma (YONEZAWA *et al.*, 2005).

Após a ligação do espermatozoide a ZP ocorre uma cascata de eventos que culminam no aumento intracelular de cálcio. Esse aumento é responsável por ativar

substâncias fisiogênicas, além de agir nos fosfolípídeos de membrana, localizados na cabeça do espermatozoide. Após a fusão e a incorporação do gameta masculino no oócito, grânulos corticais são liberados dentro do espaço perivitelínico. Isso culmina em uma extensa reorganização da zona pelúcida e/ou superfície vitelínica, conhecida como reação cortical. A reação cortical provoca um endurecimento da zona pelúcida através da liberação de enzimas, que também são responsáveis pela inativação de receptores espermáticos (ZP3), evitando assim a polispermia (DODE, 2002; HAFEZ; HAFEZ, 2004). Em suínos, 50% dos oócitos fertilizados *in vitro* são penetrados por mais de um espermatozoide (COY *et al.*, 2008, ZHANG *et al.*, 2012) ocasionando uma baixa eficiência na produção *in vitro* de embriões suínos (COY; ROMAR, 2002). Estudos tem mostrado que o uso em excesso de espermatozoides durante a FIV é uma causa para a alta incidência de polispermia (SUAREZ *et al.*, 2007). No entanto, a redução da concentração de espermatozoides utilizada para fertilização *in vitro* além de reduzir a polispermia, acaba reduzindo também a eficiência da FIV (ABEYDEERA; DAY, 1997). Dessa forma, é de grande relevância o estudo de substâncias que regulem a interação entre espermatozoides e os carboidratos na zona pelúcida, principalmente para reduzir a incidência de polispermia em suínos.

Após penetrar na zona pelúcida, a membrana plasmática do espermatozoide funde-se com a membrana do oócito, fato que estimula o oócito a completar a meiose, expelindo o segundo corpúsculo polar para dentro do espaço perivitelínico. Os cromossomos maternos (haploides) são englobados por um pronúcleo. O envelope nuclear do espermatozoide desintegra-se após a fusão com a membrana plasmática do oócito, descondensando assim a sua cromatina. Ocorre a formação de um novo envelope nuclear dentro do citoplasma do oócito, formando o pró-núcleo masculino (HAFEZ; HAFEZ, 2004). Ao final da junção dos pró-núcleos masculinos e femininos, fenômeno intitulado de singamia, o zigoto é formado com um novo arranjo citoplasmático e inicia-se uma série de divisões mitóticas, até a formação do blastocisto (GONÇALVES *et al.*, 2002).

2.4 Características das lectinas e seus efeitos durante o crescimento folicular, maturação oocitária e fertilização

2.4.1 Lectinas vegetais

Lectinas são proteínas que se ligam reversivelmente a carboidratos e não modificam os carboidratos aos quais estão ligadas (SHARON; LIS, 2004). Essas proteínas estão distribuídas amplamente na natureza, sendo encontradas em quase todos os organismos vivos, desde microorganismos, até animais vertebrados, invertebrados e plantas (LAM, 2011).

Peumans e Van Damme (1995) inicialmente classificaram as lectinas de acordo com seus sítios de atividade biológica em três grupos: merolectinas, hololectinas e quimerolectinas. As merolectinas são biomoléculas que apresentam apenas um sítio de ligação a carboidratos, sendo assim incapazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados. As hololectinas são proteínas que apresentam mais de um sítio de ligação a carboidratos, sendo capazes de aglutinar células ou precipitar glicoconjugados, tendo como representante a maioria das lectinas vegetais. As quimerolectinas são lectinas que possuem um ou mais sítios de ligação a carboidratos, além de possuir outro sítio não lectínico com atividade biológica. Posteriormente, Peumans e Van Damme, em 1998, incluíram mais uma classe de lectinas, as Superlectinas, que se referem a proteínas que apresentam dois ou mais sítios lectínicos, porém com especificidades a carboidratos diferentes (Figura 1).

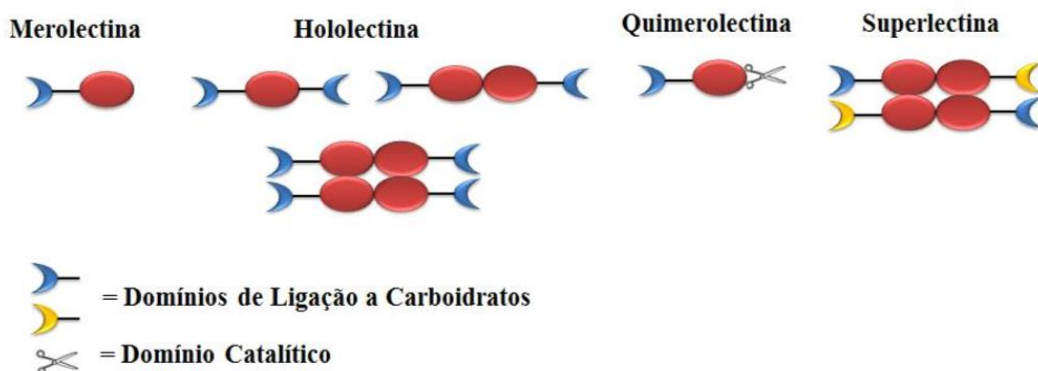


Figura 1. Classificação estrutural das lectinas vegetais de acordo com os seus sítios de atividade biológica. Representação esquemática de merolectinas, hololectinas, quimerolectinas e superlectinas.

Fonte: Adaptado de Peumans et al., 2001.

As lectinas são também classificadas de acordo com sua estrutura e evolução em sete grupos: amarantinas, lectinas ligadoras de quitina, lectinas do floema de curcubitaceae, lectinas relacionadas a jacalina, lectinas de legumes, lectinas de monocotiledôneas ligantes de manose (MMBL) e proteínas inativadoras de ribossomos (PNEUMANS *et al.*, 2001).

Muitas atividades biológicas já foram reportadas para as lectinas devido as suas características de ligação e alta especificidade. Recentemente, Cui *et al.* (2017) estudando lectinas encontradas em *Artocarpus lingnanensis*, observaram que elas possuem capacidade de induzir a mitogênese em linfócitos T. Lectinas também são capazes de regular a migração e a adesão de células bacterianas, isso foi demonstrado com lectinas extraídas de *Bauhinia variegata* (KLAFKE, 2016). Já foi reportado que estas proteínas possuem a capacidade de reconhecer carboidratos em membranas celulares e modificações no padrão de glicosilação das mesmas, tendo assim potencial para serem utilizadas como biomarcadores de células cancerígenas (SHARON; LIS 2004; YAU *et al.*, 2015).

2.4.2 Influência das lectinas na maturação oocitária e fertilização *in vitro*

Os efeitos das lectinas também têm sido investigado sobre os gametas femininos *in vitro*. Recentemente, Soares *et al.* (2018) avaliaram os efeitos da frutalina (1, 10, 50, 100 e 200 µg/mL) sobre a morfologia de folículos pré-antrais, ultraestrutura e expressão gênica em tecido cortical ovariano de cabra cultivados *in vitro*. Os autores observaram que os efeitos tóxicos mais pronunciados ocorreram quando foi utilizado as concentrações mais elevadas de frutalina (50, 100 e 200 µg/mL) e a análise ultraestrutural mostrou que os folículos atresícos continham oócitos retraídos e um grande número de vacúolos distribuídos por todo o citoplasma. Além disso, os autores observaram sinais de danos nas membranas e cristas mitocondriais. Na análise da expressão gênica, a presença da frutalina aumentou a expressão de genes pró-apoptóticos.

Os efeitos de outras lectinas sobre a ativação de folículos primordiais, manutenção e sobrevivência de folículos, bem como sobre a maturação de oócitos foram estudados (CUNHA *et al.*, 2013; PORTELA *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2001). Ribeiro *et al.* (2014) investigaram o efeito de diferentes concentrações de jacalina (0, 10, 25, 50 e 100 µg/mL) e da interação desta lectina com o FSH sobre a sobrevivência, ativação e expressão gênica em folículos primordiais caprinos cultivados *in vitro*. Este estudo demonstrou que após seis dias de cultivo, a presença de 50 µg/mL de jacalina sozinha em meio de cultivo promoveu um aumento de folículos morfológicamente normais, bem como uma redução da porcentagem de folículos primordiais e aumento de folículos em desenvolvimento, quando comparado ao meio controle. A jacalina ou FSH individualmente estimulam a ativação dos folículos e contribuem para a manutenção da viabilidade, no entanto não foi observada uma interação positiva entre essas duas substâncias. Além disso, a expressão de RNAm para os genes BMP-15 e KL após o cultivo *in vitro* de fragmentos de ovário nos diferentes tratamentos por 6 dias não foi alterada. No entanto, a presença de FSH aumentou os níveis de RNAm para o c-kit e para o PCNA, enquanto que o GDF-9 teve sua expressão reduzida em meio suplementado com jacalina (RIBEIRO *et al.*, 2014).

Wang *et al.* (2001) verificaram o efeito da fitoheglutina (PHA) em meio de maturação de oócitos bovinos e o subsequente desenvolvimento embrionário. Neste estudo, os autores relataram que a PHA não possui efeito positivo ou negativo sobre a MIV ou no desenvolvimento de embriões. O efeito desta lectina sobre o desenvolvimento de folículos ovarianos caprinos cultivados *in vitro* também foi estudado. Os autores verificaram que a presença de PHA (1, 10, 50, 100 ou 200 µg/mL) em meio de cultivo, teve capacidade de manter a sobrevivência folicular de forma dose dependente. Além disso, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações testadas e o controle no aumento do diâmetro folicular durante o cultivo. Entretanto, a PHA na concentração de 10 µg/mL mostrou ação biológica na formação de antro e estimulou um aumento nos níveis de expressão de RNAm para FSH-R e PCNA em folículos secundários caprinos cultivados por seis dias (CUNHA *et al.*, 2013)

Gonçalves *et al.* (2009) verificaram o efeito de lectinas de *Ricinus communis* e da osteopontina na ligação de espermatozoides e fertilização *in vitro*. Neste estudo, a associação das lectinas com a osteopontina melhorou a ligação espermatozoide-oócito e a fertilização *in vitro*, isto porque a lectina RCA-1 possui múltiplos locais de ligação para

resíduos galactosilo, tornando-a capaz de ligar-se tanto a osteopontina como ao oócito, atuando semelhante a uma molécula de adesão.

2.5 Efeitos da Frutalina (Lectina das sementes de *Artocarpus incisa* L.) *in vitro*

A frutalina é uma lectina extraída de *Artocarpus incisa* e possui afinidade de ligação por α -D-galactose. Sua estrutura é tetramérica composta por quatro monômeros ligados por ligações não covalentes. Cada monômero é constituído por duas cadeias, a cadeia α e a cadeia β , parcialmente glicosilada. A conformação tridimensional predominante é a folha β antiparalela (64%) contendo quatro locais de ligação a D-galactose, podendo assim ser classificada como uma hololectina.

Em virtude da especificidade anomérica por D-galactose, diversas atividades biológicas da frutalina vêm sendo relatadas, principalmente em sua aplicação nas áreas biomédicas. Muitos estudos têm demonstrado que a frutalina pode ser utilizada no diagnóstico de células cancerígenas, como lesões malignas da mama (FERREIRA, 2001), linfoma de Hodgkin (CONSTÂNCIO, 2005), câncer da tireoide (MILHOME, 2008) e câncer da próstata (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Além disso, em linhagens de células HeLa, esta lectina tem ação tóxica, causando apoptose nestas células (OLIVEIRA *et al.*, 2011). Brando-Lima *et al.* (2005) observaram que a frutalina pode atuar na indução da migração de neutrófilos *in vitro* e *in vivo*, na indução da quimiotaxia e na reorganização do citoesqueleto de neutrófilos humanos, interferindo com a motilidade celular e a resposta oxidativa. Além disso, a frutalina possui a capacidade de estimular a ativação mitogênica de linfócitos e a produção de interleucina-2 em humanos, revelando potencial para estudos de mecanismos intracelulares (BRANDO-LIMA *et al.*, 2006). Mais informações sobre a frutalina e seu mecanismo de ação encontram-se no artigo de revisão de literatura (Capítulo 1).

3 JUSTIFICATIVA

A frutalina apresenta potencial para reconhecer e se ligar às membranas celulares, e até penetrar no núcleo celular, influenciando as interações célula- célula, proliferação e morte celular (SHARON; LIS 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Além disso, algumas atividades biológicas já foram descritas para esta lectina, como a capacidade de induzir a migração *in vivo* e *in vitro* de neutrófilos, indução de quimiotaxia e reorganização do citoesqueleto, interferindo na mobilidade celular e na resposta oxidativa (BRANDO-LIMA *et al.*, 2005). Outros estudos também demonstraram que a frutalina afeta negativamente a proliferação de células HeLa em concentrações de 60, 100 e 144 µg/mL, induzindo apoptose celular e inibindo a proliferação celular, com potencial ação anticancerígena (OLIVEIRA *et al.*, 2011). No entanto, os efeitos da frutalina durante as etapas de maturação oocitária e fertilização *in vitro* na espécie suína ainda não são conhecidos.

No início da fertilização, é necessário que as proteínas da membrana espermática reconheçam os carboidratos localizados na zona pelúcida (ZP) dos oócitos, para que ocorra a penetração (BEN-YOSEF; SHALGI, 2001). Nos suínos, esta interação proteína-carboidrato ocorre através da manose e da galactose (YONEZAWA *et al.*, 2005). Nesse contexto, acredita-se que a frutalina tenha capacidade de se unir a esses carboidratos na ZP e reduzir a penetração de espermatozoides durante a fertilização em mamíferos, diminuindo os níveis de polispermia, que é considerado um problema para a fertilização *in vitro* na espécie suína (COY *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2012). Considerando que a maturação oocitária é o evento chave para o sucesso da fertilização *in vitro*, é de grande importância avaliar os efeitos de diferentes concentrações de frutalina durante a maturação *in vitro*, especialmente devido ao fato desta substância apresentar efeitos tóxicos quando utilizada em altas concentrações (SOARES *et al.*, 2018).

A utilização de biotécnicas como a maturação *in vitro* e fertilização *in vitro* para testes de substâncias traz importantes consequências ao bem-estar animal, uma vez que milhares de animais serão poupados de serem utilizados em experimentos/testes no que concerne aos testes *in vivo* (FIGUEIREDO, 2008). A espécie suína é um modelo animal bastante utilizado para oócitos humanos em testes de toxicidade (GERRITSE *et al.*, 2008; MUNN *et al.*, 1986). Além disso, a vantagem de utilizar ovários de porcas é que os ovários são obtidos a partir de animais em idade semelhante, raça e nutrição controladas.

4 HIPÓTESES

- 1) Os efeitos tóxicos da frutalina durante a maturação e fertilização de oócitos *in vitro* são dependentes das concentrações utilizadas.

- 2) A frutalina possui menor citotoxicidade do que a doxorrubicina (controle positivo) sobre oócitos suínos maturados e fertilizados *in vitro*.

- 3) A frutalina, em baixas concentrações, diminui as taxas de penetração espermática por sua ligação a carboidratos presente na zona pelúcida de oócitos suínos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivos gerais

Avaliar os efeitos da frutalina em diferentes concentrações (0,6; 6 e 60 $\mu\text{g/mL}$), durante a maturação *in vitro* (MIV) e fertilização *in vitro* (FIV) de oócitos suínos.

5.2 Objetivos específicos

- 1) Analisar os efeitos de diferentes concentrações de frutalina (0,6; 6 e 60 $\mu\text{g/mL}$) sobre a configuração da cromatina e eficiência da maturação nuclear durante a MIV.
- 2) Analisar os efeitos de diferentes concentrações de frutalina (0,6; 6 e 60 $\mu\text{g/mL}$) durante a MIV sobre os parâmetros de FIV, ou seja, taxas de penetração, monospermia, eficiência da FIV e número espermatozoides por oócitos.
- 3) Analisar os efeitos da frutalina (0,6; 6 e 60 $\mu\text{g/mL}$) durante a FIV, sobre as taxas de penetração, monospermia, eficiência da FIV e do número espermatozoides por oócitos.

6. CAPÍTULO 1

Structural characteristics and biotechnological applications of frutalin: lectin extracted
from *Artocarpus incisa*

Periódico: Ciência e Natura (Aceito para publicação)

**Structural characteristics and biotechnological applications of frutalin, a lectin
extracted from *Artocarpus incisa***

Bianca Régia Silva¹, Francisco Léo Nascimento Aguiar² e José Roberto Viana Silva^{1*}

1. Biotechnology Nucleus of Sobral, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil.
2. Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), State University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

E-mail: biancasiva-12@hotmail.com

E-mail: leo7aguiar@gmail.com

*Correspondence address: JRV Silva, Federal University of Ceara, Av. Comandante
Maurocélvio Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil. Phone / Fax: +55 88
36118000.

E-mail: jrvsilva@ufc.br

ABSTRACT

Frutalin is a lectin extracted from the seeds of *Artocarpus incisa*, which belongs to the Moreaceae family. This family consists of approximately 75 genera and 1,550 tropical species that are commonly found in pan-tropical regions. Frutalin has attracted the attention of researchers due to its ability to recognize carbohydrates in cell membranes with modifications in the glycosylation pattern. Therefore, frutalin presents a striking potential to be used as biomarker of cancer cells. Despite having a great biotechnological potential, research involving this lectin is still limited. Thus, the aim of this review is to

discuss the structural and functional characteristics of frutalin, properties, the mechanisms of action, as well as the biotechnological applications of this lectin.

Keywords: *Artocarpus incisa*, *frutalin*, *toxicity*.

1 Introduction

Lectins are glycoproteins of nonimmune origin, which have at least one non-catalytic domain that allows them to selectively recognize and bind to specific mono and oligosaccharides in a reversible manner (Peumans and Van dame 1995). These proteins have the particular ability to discriminate glycoconjugate complexes without promoting modifications in the molecular pattern (Hirabayashi et al. 2011).

The lectins are found on a large scale in a variety of living organisms, such as in plants (Carvalho et al. 2015), vertebrates (Zhang 2016) and invertebrates (Bauters et al. 2017). In addition, to have different shapes and sizes, lectins play several important biological roles (Gallego Del Sol et al. 2005). Among the biological functions, it is possible to mention the participation in the process of cell-cell recognition during fertilization, defense and cellular organization, as well as in the transport of carbohydrates and its fixation in the tissues (Kan et al. 2008; Jiang et al. 2006; Silva et al. 2008; Yoon et al. 2008; Han et al. 2010).

Among the lectins, frutalin (FTL) is extracted from the seeds of *Artocarpus incisa* L. This lectin has a tetrameric form and α -D-galactose specific link (Monteiro-Moreira et al. 2015). Then, due to its binding characteristics, FTL can recognize and fix to cell membranes, and even penetrate into the cell nucleus, influencing cell-cell interactions, communication, proliferation, and cell death mechanism (Sharon 2004; Oliveira et al. 2011). Accordingly, many biological activities have already been reported for this lectin, such as acute and neuropathic nociceptive effects (Damasceno et al. 2016), induction of neutrophil migration *in vitro* and *in vivo*, induction of chemotaxis, reorganization of the cytoskeleton of human neutrophils, cellular motility, and oxidative response (Roche et al. 2006). In addition, studies have shown that FTL can be used in the diagnosis of prostate, breast and thyroid cancer, as well as acute lymphoblastic leukemia (Oliveira et al. 2009). However, even with a prodigious biotechnological potential, little attention has been

given to FTL. Thus, the objective of this review was to discuss the structural and the functional characteristics of FTL, its mechanisms of action, as well as its promising biotechnological applications.

2 Characteristics and structural aspects of frutalin

Artocarpus incisa is a medium-sized tree, up to 15 meters in height, with deep roots and a smooth gray bark stem with 80 to 90 cm in diameter. It has large leaves (30 to 90 cm long by 30 to 45 cm wide), varying in simple, coriaceous, curved at the base, cut in 5 to 7 lobes, rarely whole, and dark green color. Its flowers do not have petals and are very small (Moreira 1998).

Several lectins have already been isolated and characterized from *Artocarpus incisa*. As example, the frutapin, a specific mannose lectin that shares many similarities to the lectins extracted from *Artocarpus integrifolia* (Monteiro 1997). Furthermore, FTL was extracted from the breadfruit, which is a glycoprotein alpha-D-galactose binding lectin containing 2.1% of carbohydrates in its structure. This lectin exhibits high levels of acid, hydroxylated and hydrophobic amino acids and low content of sulfuric amino acids (Monteiro 1998).

The FTL is a tetrameric protein, with a molecular mass of 48 KDa, and a tetramer conformation only at alkaline pH of 10, containing 153 aminoacids per monomer (Moreira 1998). Depending on the medium, the predominant three-dimensional shape is the antiparallel β -sheet (64%) containing four α -D-galactose binding sites, and it can be classified as hololectin. Its structure was described by Nepomuceno (2008) through homology modeling using the jacalin as a template protein. Previous studies demonstrated its three-dimensional structure through crystallization and analysis of data obtained by x-ray diffraction, showing that the FTL has in each monomeric unit a symmetric β prism with three groups of four β -sheets each (Vieira-Neto 2015). The carbohydrate recognition site is similar to the observed for jacalin, and is involved in the N-terminal region of the α chain, presenting a characteristic folding of the family Moraceae. The FTL binding site consists of a cavity near the N-terminal of the α chain, formed by four key residues: Gly25, Tyr146, Trp147, and Asp149. Recent studies performed by Pereira et al. (2015) led to the determination of the crystallographic structure of the FTL, and showed that it

is expressed in different isoforms, which presents variances mainly in post-transductional glycosylation (Figure 1).

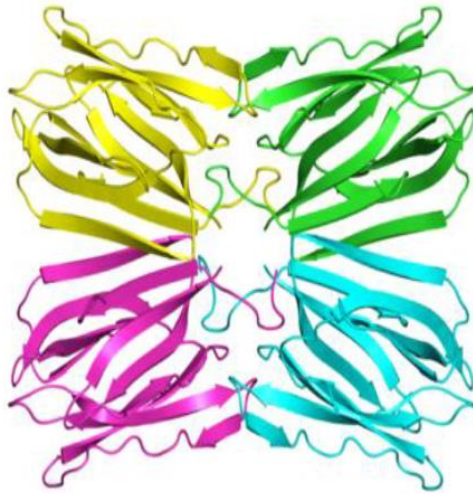


Figure 1 - Crystallographic structure of the lectin frutalin. Each color represents the four monomers.

Source:PDB: Cod. 4WOG (Pereira et al. 2015)

The protein FTL is fairly stable and the thermal denaturation triggers almost simultaneously a loosening of the tertiary structure, loss of hemagglutinating activity, and organization of secondary structure. When treated at different pH values, FTL only shows significant modifications at the secondary and tertiary structure levels, and only at pH 12. In addition, chaotropic agents are capable of denaturing FTL (Monteiro 1998).

3 Main biological activities of frutalin

3.1 Frutalin as a biomarker of neoplastic cells

Some aberrant changes in the plasma membrane glycosylation pattern are common in malignant cells, which can influence cell growth and differentiation. Previous studies showed the presence of endogenous lectins (galectins) only in precursor lesions and carcinomas (Schoeppner et al. 1995; Lalwani et al. 1996). On the other hand, with the use of vegetable lectins, such as FTL, it is possible to highlight changes in cellular glycoconjugates. Furthermore, during transformation and neoplastic progression, there is

a specific reorganization of glycoproteins present on the cell surface, exposing α -D-galactose residues to an interaction with FLT (Brockhausen 1999). Due to these changes in the glycosylation pattern in cell membranes, a particular fixation of FTL to α -D-galactose has been tested with the purpose of identifying malignant cells (Figure 2). As aforementioned reported by Ferreira (2001), the efficiency of FTL to identify malignant lesions in the breast demonstrated an ability to mark the neoplastic tissues predominantly in the cell membranes. As a result, a low intensity of cytoplasm penetration has been observed, with the increase in tumor progression. Likewise, Milhome (2003) used FTL in the study of human thyroid cancer, and concluded that FTL is an excellent marker for malign and benign cell differentiation in thyroid lesions, acting like galectin 3- labeling, an endogenous lectin biomarker of cancer cells.

Previous studies using FTL for the detection of cells associated with Hodgking lymphoma were performed by Constâncio et al. (2005). It was observed that FTL can be used to detect Reed Sternberg (RS) cells, which are cells commonly associated with Hodgking lymphoma. The FTL was also used to identify malignant cells of the human prostate cancer by the immunohistochemistry technique. It was described that the native FTL was compared to the recombinant form, which is obtained by using the expression system of *Pichia pastoris*. As a consequence, after analysis of 20 cases of prostate carcinoma, and 25 cases of benign prostatic hyperplasia, the results showed that native and recombinant FTL have different binding responses in the prostatic tissues, due to their disparities in carbohydrate binding affinities. This is explained by the molecular modifications found between native and recombinant FTL. Therefore, it has been demonstrated that both lectins can be used as histochemical biomarkers for prostate cancer (Oliveira et al. 2009).

Recently, the potential of FTL for the premature diagnosis followed by treatment of acute B-cell lymphoblastic leukemia *in vivo* has been investigated (Cavalcante et al. 2016). It was conducted the proteomic analysis of serum from pediatric patients with acute B-cell lymphoblastic leukemia (B-ALL) to identify viable biomarkers for using in early diagnosis and treatment evaluation. From this study, a panel of possible biomarkers of proteins were developed for the pre-diagnosis of B-ALL and FTL demonstrated great potential for detection of this pathology. In addition to bind cancer cells, FTL can have numerous biotechnological applications in this area. As for example, the use as carbohydrate binding probes on the cell surfaces. In addition, it can be used as tumor-

specific markers with the production of neoglycoproteins, neoglycoenzymes, pseudopolysaccharides, and anti-lectin antibodies, which may be associated with radioisotopes, enzymes, fluorochromes, biotin, anticancer drugs, cytotoxins and oligonucleotides.

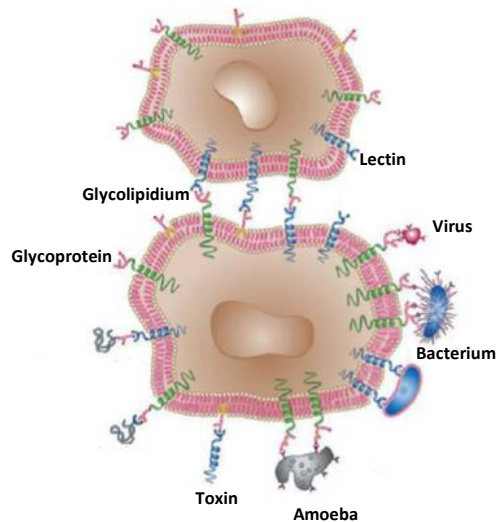


Figure 2 – Representation of the interaction between lectin-carbohydrate on the cell surface.

Source: Adapted from Sharom and Lis (2004)

3.2 Mechanisms of frutalin action and biotechnological applications

Frutalin specifically binds to homotetrameric α -D-galactose (d-Gal), which activates natural killer cells *in vitro* and promotes leukocyte migration *in vivo*. Lectins are potent lymphocyte stimulators (Brando-Lima et al. 2006), and the understanding of the interactions that occur between the molecules in the cell surfaces may aid to elucidate the mechanisms of action involved in this process.

Brando-Lima (2006) verified how FTL is capable of inducing changes in the cytoskeleton and cellular motility. Then, the authors reported that the interaction of FTL with α -D-galactose in lymphocyte membranes triggers the activation of the PI3K-Akt and NF- κ B pathways, which modulates T-cell expression and proliferation, IL-2 synthesis,

and expression of IL-2R. In addition, the authors demonstrated that FTL promotes cellular oxidation by increasing H₂O₂ production. Moreover, it is known that H₂O₂ causes significant mitochondrial damage, lipid peroxidation, and apoptosis in mouse granulosa cells (Tanabe 2015). In this context, Soares et al. (2018) reported the effects of FTL (0.6, 6.0 or 60.0 µg / mL) and doxorubicin (0.3 µg/mL) on the survival, growth, and ultrastructure of *in vitro* cultured goat secondary follicles. As main results, after 6 days of culture, FTL or doxorubicin reduced the percentage of normal follicles (P < 0.05), nonetheless doxorubicin showed greater toxicity when compared to FTL. The deleterious effects of FTL were mainly on granulosa cells, whereas doxorubicin caused degeneration in granulosa and oocyte cells. Besides, a study conducted by the same group, demonstrated the effects of FTL (1, 10, 50, 100, and 200 µg/mL) on the morphology of primordial follicles, ultrastructure, and gene expression in goat ovarian tissue cultured *in vitro*. These authors showed that 50 µg/mL FTL negatively affects follicle and ultrastructure and a large number of vacuoles were distributed throughout the oocyte cytoplasm, and signs of damage to mitochondrial membranes and ridges were also observed (Soares et al. 2018).

Oliveira et al. (2011) tested both native and recombinant FTL and showed that it can be completely internalized and activate apoptotic pathways in HeLa cells. In this study, the authors verified through immunolocalization technique, that native FTL can penetrate into the perinuclear space, where the fluorescence was most evidenced. However, the analysis of recombinant FTL had greater fluorescence found in the nucleus of HeLa cells. It is relevant to clarify that high FTL concentrations are correlated with more toxicity.

The effect of FTL on diseases of the central nervous system was also investigated by means of neurobehavioral evaluations of mice, aiming to analyze the potential of FTL as anxiogenic and antidepressant. Since several pathways can be involved in depression, many evidences have associated depression symptoms with a dysfunction in glutamatergic signaling, especially the hyperactivation of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors. In this context, antagonists of these receptors have been showed antidepressant action. Studies revealed that after intraperitoneal administration of FTL in mice, this substance produces an attenuation of the neurobehavioral effects mediated by both N-methyl-D-aspartate (NMDA) and L-Arginine /NO /cGMP receptors *in vivo* and *in silico* (Sanacora et al. 2011). Furthermore, in other study performed by Jacques (2012),

FTL demonstrated neuroprotective activity against glutamatergic neurotoxicity in a model of hippocampal slices of mice treated *in vitro* with glutamate. In this context, it was verified that FTL could reverse the scenario of depression through the glutamatergic pathway.

Recently, Damasceno et al. (2016) have shown that FTL has antinociceptive activity, indicating a possible interference with the glutamatergic system through its interaction with transient potential receptor 1 (TRPV1), suggesting that the effect of FTL on glutamate induced nociception occurs due to reduction of glutamate release via TRPV1 channel blockade. FTL acts as an antagonist of the TRPV1 channel leading to a reduction in the release of glutamate. In addition, other receptors showed a role for TRPA1 and TRPM8. Abdon et al. (2009) verified the effect of FTL against gastric damage induced by ethanol. It was reported that FTL has protective effects against gastric damage induced by ethanol. In addition, FTL decreases gastric lesions through its action in stimulating endogenous prostaglandins, nitric oxide, and opening of ATP and K⁺ channels. However, FTL failed to prevent ethanol-induced changes in meaning glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA). Hence, FTL may be a good therapeutic agent for the development of new drugs for the treatment of gastric ulcer.

6 Final considerations

Frutalin has several biological activities such as antinociceptive, antitumor, gastroprotective, cytotoxic and the ability to recognize cancer cells, thus presenting an excellent biotechnological potential, especially in the area of toxicity and diagnosis of cancer cells. However, more studies are required to qualify the clinical use of this lectin.

7 Bibliography

ABDON APV, SOUZA GC, SOUZA LNC. Gastroprotective potential of frutalin, α -D-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. *Fitoterapia*. 2012;83, (3):604-608.

BRANDO-LIMA AC, et al. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase–Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. *International Immunopharmacology*. 2006;6:465–472.

BRANDO-LIMA AC, SALDANHA-GAMA RF, HENRIQUES MGMO, MONTEIRO-MOREIRA ACO, MOREIRA RA, BARJA-FIDALGO C. Frutalin, a galactose-binding

lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005;208:145-154.

BROCKHAUSEN I. Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta – General Subjects*. 1999;1473(1):67-95.

CARVALHO JCT. *Fitoterápicos Anti-inflamatórios*. Ribeirão Preto: Tecmed, 2015;116:125-131.

CAVALCANTE MDES, et al. A panel of glycoproteins as candidate biomarkers for early diagnosis and treatment evaluation of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Biomarker Research*. 2016;4-1.

CONSTANCIO APN. *Utilização da Frutalina, uma lectina α -D-galactose ligante de Artocarpus incisa L., no estudo dos linfomas de Hodgkin forma clássica, em Ceará/CE [dissertação]*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/UFC, 2005.

DAMASCENO MB, et al. Frutalin reduces acute and neuropathic nociceptive behaviours in rodent models of orofacial pain. *Chemico-Biological Interactions*. 2016;256:9-15.

FERREIRA MVP. *Frutalina, lectina α -D-galactose ligante de Artocarpus incisa L. Um estudo com câncer de mama [thesis]*. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/UFC; 2001.

GALLEGO DEL SOL F, NAGANO C, CAVADA BS, CALVETE JJ. The first crystal structure of a Mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain, *J. Mol. Biol.* 2005;353:574-583.

HAN C, JIN J, XU S, LIU H, LI N, CAO X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. *Nat. Immunol.* 2010;11:734–742.

HARABAYASHI J, KUNO A, TATENO H. Lectin-based structural glycomics: a practical approach to complex glycans. *Electrophoresis*. 2011; 32:1118-1128.

JIANG JF, HAN Y, XING LJ, XU YY, XU ZH, CHONG K. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. *Toxicon*. 2006;47:133–139.

KHATAM MRI, SABBAG MRPH, NIKRAVAN N, KHAZAEIPOUR Z, BOROUMAND MA, SADEGHIAN S, DAVOUDI B. The role of neutrophil-gelatinase-associated lipocalin in early diagnosis of contrast nephropathy. *Indian J Nephrol*. 2015;25:292–296.

KIM HJ, LEE SJ. Antibody-based enzyme-linked lectin assay (ABELLA) for the sialylated recombinant human erythropoietin present in culture supernatant. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2008;48(3):716–721.

LALWANI AK, CAREY TE, GOLDSTEIN IJ, PETERS BP. Lectin binding characteristics of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Acta Otolaryngol.* 1996;116(1):125-131.

MILHOME MVL, FERREIRA FVA, SCHMITT FCL, ROCHA FILHO FD, MOREIRA RA. Frutalin alpha D galactose binding-lectin, antifrutalin rabbit antibody (FTLrab), galectin3, CK19 and HBME1 as cyto and histological thyroid carcinoma markers. *Revista Médica do Paraná.* 2004;62-94.

MONTEIRO ACO. Características químicas, físico-químicas e estruturais da frutalina: uma lectina D-galactose ligante de *Artocarpus incisa*, em Ceará/CE [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/UFC; 1998.

MONTEIRO-MOREIRA AC, PEREIRA HD, VIEIRA NETO AE, MORENO FBMB, LOBO MDP, SOUSA FD, MOREIRA RA. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of frutalin, an -D-galactose-specific lectin from *Artocarpus incisa* seeds. *Acta Crystallographica.* 2015;7:1282-1285.

MOREIRA RA, AINOUZ IL. Isolectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. *Plant. Physiology.* 1978:61-118.

NEPOMUCENO DR. Clonagem e expressão de uma lectina de *Artocarpus incisa* L. (Frutalina) em *Escherichia coli*, em Ceará/CE [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/UFC; 2008.

OLIVEIRA C, FELIX W, MOREIRA RA, TEXEIRA JA, DOMINGUES L. Expression of frutalin, an α -d-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris* protein expression and purification. *Protein Expression and Purification.* 2008;60:188–193.

OLIVEIRA C, NICOLAU A, TEXEIRA JA, DOMINGUES L. Cytotoxic Effects of Native and Recombinant Frutalin, a Plant Galactose-Binding Lectin, on HeLa Cervical Cancer Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2011:16-10.

OLIVEIRA C, TEIXEIRA JA, SCHMITT F, DOMINGUES L. A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. *BMC Biotechnology.* 2009:9-78.

OLIVEIRA C, TEXEIRA JA, DOMINGUES L. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application – the frutalin. *Frontiers in Plant Science.* 2014;8:5-390.

PEREIRA C, et al. Involvement of AKT and NFkappa-B on lymphocyte activation by frutalin, a galactose-binding lectin. Nitric Oxide, Cytokines and inflammation-An International Symposium. 2004;95:1072-1081.

PEREIRA HM, et al. Crystal Structure of Frutalin from *Artocarpus incisa*. *Protein Data Bank.* 2015; 227:292-293.

PEUMANS WJ, VAN DAMME EJM. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiology*. 1995;109(2):347-352.

SILVA WJ, et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. *Bioresour. Technol.*, 2008;99:3251-325.

SCHOEPPNER HL, RAZ A, HO SB, BRESALIER RS. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. *Cancer*. 1995;75(12):2818-26.

SHARON N, LIS H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004;14(11):53–62.

YOON KS, LEE KP, KLOCHKOVA TA, KIM GH. Molecular characterization of the lectin, bryohealin, involved in protoplast regeneration of the marine alga *Bryopsis plumosa* (Chlorophyta). *J Phycol*. 2008;44:103–112.

VIEIRA NETO AE. Caracterização estrutural da frutalina, uma lectina a-D-galactose ligante de sementes de *Artocarpus incisa* e análise das suas bases moleculares de ligação a D-galactose, em Ceará/CE [dissertação]. Ceará: Universidade Federal do Ceará/UFC; 2015.

ZHANG DL, LU CH, YU DH, WANG ZY. Characterization and functional analysis of a tandem-repeat galectin-9 in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. *Fish and Shellfish Immunology*. 2016;26(3):791-810.

7. CAPÍTULO 2

Dose-dependent effects of frutalin on *in vitro* maturation and fertilization of pig oocytes

Periódico: Animal Reproduction Science (Aceito para publicação)

Dose-dependent effects of frutalin on *in vitro* maturation and fertilization of pig oocytes

B.R. Silva^a, Maside C.^b, Vieira L.A.^b, Cadenas J.^b, Alves B.G.^b, A.C.A. Ferreira^b,
F.L.N. Aguiar^b, A.L.C. Silva^b, Figueiredo J.R.^b and J.R.V. Silva^{a*}

^aBiotechnology Nucleus of Sobral, Federal University of Ceara, Sobral, CE, Brazil

^bLaboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA). State University of Ceara, Fortaleza-CE, Brazil

*Correspondence address: JRV Silva, Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocélvio Rocha Ponte 100, CEP 62041-040, Sobral, CE, Brazil; Phone/Fax: +55 88 36118000; E-mail: jrvsilva@ufc.br

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of frutalin (FTL) on *in vitro* maturation (IVM), and fertilization (IVF) of pig oocytes. In the Experiment 1, cumulus-oocyte complexes (COCs) were submitted to IVM in maturation medium alone or supplemented with different FTL concentration (0.6, 6 and 60 µg/mL), or 0.3 µg/mL doxorubicin (DXR). After IVM, some oocytes were evaluated for chromatin configuration, and the remaining oocytes were submitted to *in vitro* fertilization. In Experiment 2, matured oocytes were fertilized in IVF medium alone (control) or in presence of different FTL concentration (0.6, 6 and 60 µg/mL), or 0.3 µg/mL DXR. After 18 h post fertilization, the endpoints penetration rate, monospermy, spermatozoa per oocyte, and the IVF efficiency were evaluated in both experiments. In Experiment 1, 6 and 60 µg/mL FTL, as well as DXR increased ($P < 0.05$) the rate of oocytes with abnormal chromatin configuration when compared to oocyte matured in control medium alone or supplemented with 0.6 µg/mL FTL. The percentage of meiotic resumption in oocytes cultured with 60 µg/mL FTL or DXR was less ($P < 0.05$) than in the other treatments. Moreover, oocytes matured with 6 or 60 µg/mL FTL and DXR had a lesser IVM efficiency when compared to those matured with 0.6 µg/mL FTL or in control medium. Additionally, there was a greater ($P < 0.05$) with culture in a medium containing 6 µg/mL FTL for the rate of partenogenetically activated oocytes when compared with the other

treatments. Culturing of COCs during IVM in a medium containing 6 or 60 FTL resulted in a lesser ($P < 0.05$) sperm penetration and spermatozoa/oocyte rates when compared to other treatments, and IVF efficiency was less ($P < 0.05$) than that in control medium alone or with a medium containing 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FTL. In Experiment 2, culturing in a medium containing 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FTL resulted in greater ($P < 0.05$) monospermy and IVF efficiency rates when compared to culturing in the control medium. In addition, culturing in a medium with 6 and 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FTL resulted in a lesser ($P < 0.05$) spermatozoa penetration, sperm/oocyte rates and IVF efficiency, although there were greater ($P < 0.05$) monospermy rates. In conclusion, culturing in a medium containing 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ FTL resulted in lesser spermatozoa penetration rates and number of spermatozoa/oocyte increasing the IVF efficiency without harmful effects. Use of a greater concentration of FTL in the medium has toxic effects during oocyte maturation and results in a reduced IVF efficiency.

Keywords: *Artocarpus incisa*; Frutalin; *In vitro* maturation; *In vitro* fertilization

1. Introduction

Frutalin (FTL), a lectin with α -D-galactose-specific binding sites, is isolated from the seeds of *Artocarpus incisa* L., a widely-distributed plant belonging to the Moreaceae family (Moreira et al., 1998; Monteiro-Moreira, et al., 2015). Lectins, like FTL, are proteins from non-immune origin, i.e., are not produced in response to an immune stimulation, and bind specifically and reversibly to free sugars or residues of glycoconjugates (Van Damme, et al., 1998). Coupled with an α -D-galactose binding specificity, FTL can bind to cell membranes, and even penetrate into the cell nucleus, influencing cell-to-cell interactions, proliferation, and cell death (Sharon and Lis 2004; Oliveira, et al., 2011). Moreover, some biological activities have already been described for this lectin. Brando-Lima et al. (2005) observed that FTL induces *in vivo* and *in vitro* migration of neutrophils, chemotaxis induction, and reorganization of cytoskeleton, interfering with cellular motility and oxidative response. Furthermore, studies have shown that FTL negatively affects HeLa cell proliferation at concentrations of 60, 100 and 144 $\mu\text{g/mL}$, inducing cellular apoptosis, and inhibiting cell proliferation, having a potential anticarcinogenic action (Oliveira, et al., 2011). It, however, is known that many drugs used to treat cancer, such as doxorubicine (DXR), can be a deleterious to oocyte integrity, and consequently affect processes like maturation and consequently impairing fertilization. Recently, Soares et al. (2018) reported there was an increase in the expression of pro-apoptotic genes with a detrimental effect on oocyte and primordial follicle morphology after FTL treatment in *in vitro* culture of goat ovarian cortical tissue. The oocyte integrity is an important factor to reach the competence for maturation and fertilization (Roth and Hansen, 2005).

During oocyte fertilization, spermatozoa membrane proteins recognize carbohydrates located in the zona pellucida, which is an important aspect of spermatozoa penetration (Ben-Yosef and Shalgi, 2001). In pigs, this protein-carbohydrate interaction occurs through mannose and galactose (Yonezawa et al., 2005). In swine, penetration of oocytes by more than one spermatozoon affects approximately 50% of *in vitro* fertilized oocytes (Coy et al., 2008, Zhang et al., 2012). Consequently, the *in vitro* production of pig embryos from genetically superior animals or endangered breeds is hampered (Coy and Romar, 2002). The use of excessive numbers of spermatozoa during *in vitro* fertilization (IVF) is one cause for the relatively greater incidence of polyspermy (Suarez et al., 2007). Reduction in the concentration of spermatozoa used for IVF decreases

polyspermy, but it also reduces IVF efficiency (Abeydeera and Day 1997). Thus, it is very important to study the effects of substances that regulate interaction between spermatozoa and carbohydrates in the zona pellucida, especially in reduction of the incidence of polyspermy in pigs. We have hypothesized that FTL, at relatively lesser concentrations, would have no toxic effects on pig oocytes.

To the best of our knowledge, there is no information about the effects of FTL in binding to carbohydrates of the ZP and in blocking spermatozoa penetration during fertilization in mammals, including pigs. The aim of the present study, therefore, was to investigate the effect of FTL on IVM, as well as its effect on IVF in pig oocytes, using the following end points: (i) normal chromatin configuration, (ii) meiotic resumption rate, (iii) maturation efficiency, (iv) penetration rate, (v) monospermy, (vi) number of spermatozoa/oocyte, and (vii) IVF efficiency.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

Unless otherwise indicated, the chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). The recovery and washing medium for cumulus-oocyte complexes (COCs) was Dulbecco's phosphate-buffered saline medium (DPBS) composed of 136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ and 1.46 mM CaCl₂·2H₂O supplemented with 4 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 0.34 mM sodium pyruvate, 5.4 mM D-glucose and 70 µg/mL kanamycin (mDPBS). The maturation medium (TCM-199⁺) was modified-TCM199 supplemented with 100 µM cysteamine, 10 ng/mL epidermal growth factor and fertilization medium (IVF medium) was a modified Tris-buffered medium, as previously described (GIL, et al., 2003). Briefly, this medium consisted of 113.1 mM NaCl, 3 mM KCl, 7.5 mM CaCl₂·2H₂O, 20 mM Tris (crystallized free base), 11 mM glucose, 5 mM sodium pyruvate supplemented with 2 mM caffeine, and 0.2% BSA fraction V. The embryo embryonic culture medium was NCSU-23 supplemented with 0.4% BSA (Abeydeera and Day, 1997).

2.2. Isolation of FTL from *Artocarpus incisa*

The mature seeds from *A. incisa* were cutted into small fragments, dried in acetone (P.A), and a fine powder was obtained using a coffee mill. The powder was incubated in phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) at 1:10 ratio (w/v) at room temperature (approximately 25 °C) with continuous stirring for 2 h before the centrifugation at 10,000x g for 20 min at 5 °C. The supernatant (crude extract) was precipitated with ammonium sulfate (0%-90% saturation, F0/90), and centrifuged at 12,000x g for 30 min at 5 °C. The pellet was suspended and dialyzed in PBS. The protein solution (F0/90) was applied to an agarose-D-galactose column (8 x 1 cm) and equilibrated with the same buffer. Thereafter, the unbound material was removed, and the frutalin was eluted with 100 mM D-galactose in an equilibrium solution. The presence and purity of the lectin in the pooled fractions were checked by SDS-PAGE 15%, according to its molecular weight. The fractions containing pure frutalin were dialyzed against PBS, and concentrated in 10 KDa Amicon® (Millipore) tubes. Details of isolation and purification methods were previously described by Moreira et al. (1998).

2.3. Experimental design

2.3.1. Experiment 1: Effect of FTL on IVM of pig COCs and subsequent IVF

The ovaries were obtained from prepuberal females at a local slaughterhouse, and transported to the laboratory in 0.9% NaCl with 70 µg/mL kanamycin, at 33 °C within 1 h. Then, COCs were aspirated from medium-sized follicles (3 to 6 mm in diameter) using a 10 mL disposable syringe connected to an 18 gauge needle. The COCs with a compact cumulus mass, and a dark granulated cytoplasm were selected and washed three times in maturation medium for IVM.

Immediately after recovery, COCs were randomly allocated into five treatments as follow: I) TCM 199⁺ (control), or supplemented with different concentration of FTL II) 0.6 µg/mL (0.6 FTL); III) 6.0 µg/mL (6 FTL) or IV) 60.0 µg/mL (60 FTL) and V) 0.3 µg/mL doxorubicin (DXR). For IVM, 50 to 60 oocytes were transferred into each well of a 4-well multidish (Nunc, Roskilde, Denmark) containing 500 µL of maturation medium supplemented with 10 UI/mL pregnant mare's serum gonadotropin and 10 UI/ human

chorionic gonadotropin for 22 h. The COCs were subsequently incubated for another 20 to 22 h in maturation medium without hormones. Oocyte maturation was carried out at 39 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After IVM, COCs were mechanically denuded and washed twice in maturation medium without hormones. Some denuded oocytes were randomly selected to assess IVM variables. The remaining oocytes were submitted to IVF. Briefly, groups of 30 denuded oocytes were placed in 50 µL drops of IVF medium in a 35x10 mm Petri dish under mineral oil, and held at 38.5 °C in an atmosphere of 5% CO₂ in air for approximately 30 min until the addition of spermatozoa. A pool of freshly ejaculated semen diluted in extender from three boars with proved reproductive efficiency was obtained from a local breeding station. The semen was subsequently washed three times by centrifugation at 1900 x *g* for 3 min in mDPBS and the resulting pellet was re-suspended in IVF medium. The spermatozoa suspension (50 µL) was added to a drop of IVF medium containing the oocytes. The oocyte/spermatozoa ratio was 1:2000. Hence, the gametes were co-incubated at 38.5 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air for approximately 4 h. Presumptive zygotes were removed from the IVF medium, and washed three times in NCSU 23 culture medium. The zygotes were transferred to a 4-well plate (30 oocytes /well) with 500 µL of culture medium. At 18 h post-insemination, presumptive zygotes were fixed to evaluate the fertilization variables.

2.3.2. Experiment 2: Effect of FTL on IVF of *in vitro* matured oocytes

Oocytes were matured *in vitro* as previously described, however, in the absence of frutalin. Oocytes were then randomly assigned to five treatment groups: I) IVF medium alone (control) or supplemented with different concentration of FTL II) 0.6 µg/mL (0.6 FTL); III) 6 µg/mL (6 FTL) or IV) 60 µg/mL (60 FTL) and V) 0.3 µg/mL doxorubicin (DXR).

2.4. Assessment of IVM and IVF variables

After 44 h and 18 h post-insemination., to evaluate IVM and IVF variables respectively, denuded oocytes were washed in PBS-BSA, and incubated in 500 µL droplets containing 0.5% glutaraldehyde and 10 µM Hoechst 33342 for 15 min. Oocytes

were subsequently mounted on a glass slide and examined under a fluorescence microscope (Nikon, Eclipse 80i, Tokyo, Japan) for evaluation of chromatin configuration in IVM and IVF. The chromatin configuration patterns used to assess IVM variables were the following: abnormal chromatin configuration, meiotic resumption, metaphase I and metaphase II. Abnormal chromatin configuration was defined as oocytes with nuclear pyknosis or condensed chromatin, or pseudo “non surrounded nucleolus-to-surrounded nucleolus” (NSN-NS) transition reminiscent (Lin et al., 2016). Meiotic resumption was defined to have occurred when the nucleus was in the germinal vesicle break down (GVBD), metaphase I (MI), metaphase II (MII) or activated oocyte stage. Oocytes were considered activated when each contained one or two well-developed pronuclei. The IVM efficiency was calculated as the number of oocytes in metaphase II stage/total oocytes cultured.

The endpoints to assess the IVF variables were: spermatozoa penetration rate (oocytes with one or more swollen spermatozoa heads and/or male pronuclei and two polar bodies (penetrated oocytes)/total of matured oocytes); monospermy rate (oocytes with only one male pronucleus/total penetrated oocytes); IVF efficiency (number of monospermy oocytes/total oocytes fertilized); number of spermatozoa/oocyte (mean number of spermatozoa per penetrated oocytes).

2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using Sigma Plot 11.0 software (Systat Software Inc., USA). The Shapiro-Wilk test was used to evaluate the data distribution. All the endpoints were represented as percentages, and the comparison among treatments were evaluated by chi-square and Fisher's test. Values were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1: Effect of FTL on IVM of pig COCs and subsequent IVF

The data for effects of FTL on IVM and subsequent IVF are included in Tables 1 and 2. The results indicated that inclusion of 6 and 60 $\mu\text{g/mL}$ FTL in the medium, as well

as DXR increased ($P < 0.05$) the incidence of abnormal chromatin configuration of oocytes when compared to those matured in a medium containing 0.6 $\mu\text{g/mL}$ FTL or the control medium. Characteristics of oocyte chromatin configuration after 44 h of *in vitro* maturation are displayed in Figure 1. To determine meiotic resumption, only oocytes with normal chromatin configuration were used. The percentage of meiotic resumption with inclusion of 60 $\mu\text{g/mL}$ FTL or DXR the medium was less ($P < 0.05$) than that for the other treatments. Moreover, culturing with 6 and 60 $\mu\text{g/mL}$ FTL or DXR in the medium resulted in lesser maturation rates and IVM efficiency when compared to oocytes matured when culturing in medium containing 0.6 $\mu\text{g/mL}$ FTL or in control medium, thus, both rates decreased with increasing concentrations of FTL. Surprisingly, the inclusion of 6 $\mu\text{g/mL}$ FTL in the culture medium resulted in a greater ($P < 0.05$) rate of oocyte activation when compared with the other treatments. Culturing of COCs during IVM in the medium containing 6 or 60 $\mu\text{g/mL}$ FTL resulted in lesser ($P < 0.05$) spermatozoa penetration and spermatozoa/oocyte rates compared with culturing in the medium containing 0.6 $\mu\text{g/mL}$ FTL and the control medium, however, IVF efficiency was less ($P > 0.05$). In addition, there were no significant differences in results with use of the control medium and with inclusion of 6 $\mu\text{g/mL}$ FTL to the medium for all IVF variables studied (i.e., spermatozoa penetration, monospermy, IVF efficiency and number of spermatozoa/oocyte; $P > 0.05$).

5.2. Experiment 2: Effect of FTL on IVF of *in vitro* matured oocytes

Data are included in Table 3 for the effect of FTL on IVF of *in vitro* matured oocytes after 18 h post-insemination. The spermatozoa penetration rate was greater in the control group when compared with oocytes cultured in a medium with different concentrations of FTL. When 0.6 $\mu\text{g/mL}$ FTL was included in the medium, there were greater rates of monospermy ($P < 0.05$) and a greater IVF efficiency when compared with other treatments. In addition, using 6 or 60 $\mu\text{g/mL}$ FTL resulted in a lesser ($P < 0.05$) spermatozoa penetration, spermatozoa/oocyte rates and IVF efficiency, although there was a greater ($P < 0.05$) monospermy rate.

4. Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to report the effects of different concentration of FTL on oocyte maturation and fertilization in pigs. Frutalin is the most abundant lectin in *Artocarpus incisa* seeds with several biomedical applications, such as immunomodulatory effects, anti-tumor properties, tumor biomarker properties and cytotoxicity actions (Oliveira et al., 2011; Brando-Lima et al., 2005, 2006).

After the 44 h of culture with FTL during IVM, a dose dependent increase in the incidence of oocytes having abnormal chromatin configuration was observed. Moreover, and similarly, the greater concentration of FTL in the medium (60 µg/mL) negatively affected other IVM variables such as MII rate and maturation efficiency. Consistent with the present results, Oliveira et al. (2011) reported that 60 µg/mL FTL induced apoptosis in Hela cells *in vitro*. In addition, cytotoxicity of FTL was also observed in goat primordial follicles when concentrations from 50 to 200 µg/mL FTL were used in the medium (Soares et al., 2018). Previous studies indicate that FTL binds to α -D-galactose in cell membranes and induces a marked oxidative increase, which in turn stimulates intracellular production of H₂O₂ (BRANDO-LIMA, et al., 2005). As reported by Tanabe (2015), relatively greater concentrations of H₂O₂ may lead to mitochondrial damage, lipid peroxidation and apoptosis in mice granulosa cells, consequently affecting the communication between oocytes and granulosa cells, which is essential for oocyte maintenance and survival (Bilodeau-Goeseels, 2011). Including FTL (0.6 µg/mL) in the medium for culturing of COCs during IVM resulted in no harmful effects on IVM variables in the present study, and did not affect IVF variables. In other studies, inclusion of lesser concentrations of frutalin in the culture medium had no toxic effects on Hela cell lines (18 µg/mL - Oliveira et al., 2011) or goat ovarian follicles (1 µg/mL; Soares, et al., 2018).

Surprisingly, there was a relatively greater rate of parthenogenetically in activated oocytes after maturation in medium supplemented with 6 µg/mL FTL. In mammals, the parthenogenesis or activation can occur through the use of agents (e.g., calcium ionophore, strontium and thimerosal) that cause oscillations of intracellular or extracellular calcium concentrations. Results of the present study support the hypothesis that FTL binds to the ZP and penetrates the oocyte, increasing intracellular Ca²⁺, which could activate the P3IK/Akt signaling pathway (Brando-Lima, et al., 2005).

Consequently, the active form of Akt can induce rapid cell progression of responses that occur naturally when oocytes are activated, such as increased calcium concentrations, decreased MPF concentrations, and ultimately lead to parthenogenetic activation. Additionally, *in vitro* parthenogenetic activation in pig oocytes can be induced by nitric oxide (NO; Petr et al., 2005). Considering the results reported by Araújo et al. (2018) NO is probably a mediator of the effects of FTL, therefore, the possibility that FTL activation of pig oocytes through the NO pathway cannot be excluded.

Pig oocytes cultured in media that contained DXR during 44 h of IVM had the most marked effects with regard to chromatin configuration, meiotic resumption rate and maturation efficiency. Previous studies have been conducted to assess DXR actions by altering the activity of intracellular or intra-mitochondrial oxidative enzymes, as well as by enhancing binding to topoisomerases promoting dysfunction, and this has led to DNA damage and apoptosis (Tokarska-Schlattner et al., 2006). These results confirm that the greatest abnormal chromatin configuration was observed during IVM of pig oocytes treated with DXR.

Interestingly, after 18 h of IVF, the oocytes incubated with 0.6 $\mu\text{g/mL}$ FTL had less spermatozoa penetration and greater monospermy rates which resulted in greater efficiency of IVF. Although the polyspermic zygotes developed into embryos and blastocysts were produced that were morphologically similar to monospermic blastocysts, polyspermic-developed blastocysts did not develop into fetuses after embryo transfer (Han, et al., 1999). Additionally, when increasing the concentrations of FTL, a progressive reduction in spermatozoa penetration and increase in monospermy rate occurred. Competition between frutalin and spermatozoa for the same binding sites can explain these results. A lectin-ligand binding mechanism was previously described as a possible polyspermy blocker (Hedrick, 2007). There have been previous reports that the glycoproteins, ZPB (pZP3 α) and ZPC (pZP3 β), are the spermatozoa binding sites in the oocyte membranes of pigs, revealing that the terminal β -galactose residues function as the ligand sites for spermatozoa binding (Yonezawa et al., 2005). Similarly, FTL specifically binds to D-galactose residues, and is possibly linked to the residues of the galactose found in oocyte ZP glycoproteins of pigs. Thus, the interaction between FTL and D-galactose residues create a barrier for the spermatozoa, preventing from the penetration into oocyte, and this could explain the occurrence of the reduction in spermatozoa binding, penetration and the relatively greater monospermy rate observed in

the present study. Previously, several attempts have been made to improve the success of IVF in pigs, by using a combination of oviduct fluid and heparin (Batista et al., 2016), and co-culturing spermatozoa with oviductal (Nagai and Moor, 1990) and follicle cells (Wang et al., 1992). These techniques, however, are often laborious due to the need to prepare the oviductal or follicular cells in an attempt to mimic *in vivo* conditions of the ovary and oviducts.

In conclusion, inclusion of the relatively lesser concentrations of FTL (0.6 µg/mL) in the medium in the present study resulted in reduced spermatozoa penetration rates and increased IVF efficiency without any deleterious effects during IVF. The inclusion of FTL in the medium at concentrations of 6 and µg/mL had harmful effects in a concentration-dependent manner during IVM and subsequently IVF. These results indicate there are possibilities for the use of lesser concentrations of FTL in the culture medium to reduce the incidence of polyspermy during IVF in swine.

Conflict of interest

There was no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgments

This research was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, grant number 552376/2011-6).

References

- Araújo, J.R.C., Júnior, J.M.A.M., Damasceno, M.B.M.V.D., Santos, S.A.A.R., Vieira-Neto, A.E., Lobo, M.D.P., Campos, A.R., Moreira, R.A., Monteiro-Moreira, A.C.O., 2018. Neuropharmacological characterization of frutalin in mice: evidence of an antidepressant-like effect mediated by the NMDA receptor/NO/cGMP pathway. *Int. J. Biol. Macromol.* 31 (112), 548-554.
- Abeydeera, L.R., Day, B.N., 1997. Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified tris-buffered medium with frozen thawed ejaculated spermatozoa. *Biol. Reprod.* 57, 729–734.
- Batista, R.I.T.P., Moro, L.N., Alminana, E.C.C., Souza-Fabjan, J.M.G., Freitas, V. J.F., Mermillod, P., 2016. Combination of oviduct fluid and heparin to improve

- monospermic zygotes production during porcine *in vitro* fertilization. *Theriogenology* 86, 495–502.
- Ben-Yosef, D., Shalgi, R., 2001. Oocyte activation: lessons from human infertility. *Trends Mol. Med.* 7, 163–169.
- Bilodeau-Goeseels, S., 2011. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence? *Reprod. Domest. Anim.* 47 (4), 687-693.
- Brando-Lima, A.C., Saldanha-Gama, R.F., Henriques, M.G.M.O., Monteiro-Moreira, A.C.O., Moreira, R.A., Barja-Fidalgo, C., 2005. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 208, 145-154.
- Brando-Lima, A.C., Saldanha-Gama, F.R., Pereira, C.R., Villela, C.G., Sampaio, A.L.F., Monteiro-Moreira, A.C.O. Henriques, M.O.M.G., Moreira, R.A., Barja-Fidalgo, C., 2006. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase–Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. *International Immunopharmacology* 6, 465–472.
- Coy, P., Cánovas, S., Mondéjar, I., Saavedra, M.D., Romar, R., Grullón, L., 2008. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 15809–15814.
- Coy, P., Romar, R., 2002. *In vitro* production of pig embryos: a point of view. *Reprod. Fertil Dev.* 14, 275–286.
- Gil, M., Abeydeera, L., Day, B., Vazquez, J., Roca, J., Martinez, E., 2003. Effect of the volume of medium and number of oocytes during *in vitro* fertilization on embryo development in pigs. *Theriogenology* 60, 767–776.
- Han, Y.M., Wang, W.H., Abeydeera, L.R., Petersen, A.L., Kim, J.H., Murphy, C., Day B.N., Prather, R.S., 1999. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. *Biol. Reprod.* 61 (5), 1340-1346.
- Hedrick, J.L., 2007. A comparative analysis of molecular mechanisms for blocking polyspermy: identification of a lectin–ligand binding reaction in mammalian eggs. *Soc. Reprod. Fertil. Suppl.* 63, 409-419.
- Lin, J., Chen, F., Sun, M.J., Zhu, J., Li, Y.W., Pan, L.Z., Zhang, J., Tan, J.H., 2016. The relationship between apoptosis, chromatin configuration, histone modification and competence of oocytes: A study using the mouse ovary-holding stress model. *Sci. Rep.* 20 (6), 283-247.
- Monteiro-Moreira, A.C., Pereira, H.D., Vieira Neto, A.E., Moreno, F.B.M.B., Lobo, M.D.P., Sousa, F.D., Moreira, R. A., 2015. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies, of frutalin, an α -D-galactose-specific lectin from *Artocarpus incisa* seeds. *Acta Cryst.* 7, 1282-1285.
- Moreira, R.A., Castelo-Branco, C.C., Monteiro, A.C., Tavares, R.O., Beltramini, L.M., 1998. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. *Phytochemistry.* 47, 1183–1188.
- Nagai, T., Moor, R.M., 1990. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 26, 377–381.
- Oliveira, C., Nicolau, A., Teixeira, J.A., Domingues, L., 2011. Cytotoxic effects of native and recombinant frutalin, a plant galactose-binding lectin, on HeLa cervical cancer cells. *J. Biomed. Biotechnol.* 1-9.

- Petr, J., Rajmon, R., Rozinek, J., Sedmíková, M., Jeseta, M., Chmelíková, E., Svestkova, D. and Jilek, F., 2005. Activation of pig oocytes using nitric oxide donors. *Mol. Reprod. Dev.* 71, 115–122.
- Roth, Z., Hansen, P.J., 2005. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. *Reproduction* 129, 235-244.
- Soares, M.A., Costa, J.J., Vasconcelos, G.L., Ribeiro, R.P., Souza, J.C., Silva, A.L., 2018. Effects of frutalin on early follicle morphology, ultrastructure and gene expression in cultured goat ovarian cortical tissue. *Histol. Histopathol.* 33, 41-53.
- Sharon, N., Lis, H., 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* 14 (11), 53–62.
- Suarez, S.S., 2007. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. *Reprod Fertil Dev.* 19,103–110.
- Tanabe, M., Tamura, H., Taketani, T., Okada, M., Lee, L., Tamura, I., Maekawa, R., Asada, H., Yamagata, Y., Sugino, N., 2015. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *J. Reprod.* 61, 35-41.
- Tokarska-Schlattner, M., Wallimann, T., Schlattner, U., 2006. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. *Biologies.* 329, 657–668.
- Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Barre, A., Rouge, P., 1998. Plant lectins: a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. *Crit Rev Plant Sci.* 17, 575-692.
- Wang, W.H., Uchida, M., Niwa, K., 1992. Effects of follicle cells on *in vitro* penetration of pig oocytes by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. *J. Reprod. Dev.* 38, 125–131.
- Yonezawa, N., Amari, S., Takahashi, K., Ikeda, K., Imai, F.L., Kanai, S, Kikuchi, K., Nakano, M., 2005. Participation of the nonreducing terminal b-galactosyl residues of the neutral N-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm–egg binding. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 222–227.
- Zhang, P., Zhang, Y., Dou, H., Yin, J., Chen, Y., Pang, X., et al., 2012. Handmade cloned transgenic piglets expressing the nematode fat-1 gene. *Cell Reprogram.* 14, 258–266.

Legends of tables and figures:

Table 1

Variables of IVM in pig COCs cultured in media for 44 h with different concentrations of FTL and DXR during IVM

Table 2

Variables of IVF in pig oocytes cultured in media with different concentrations of FTL and DXR during *in vitro* maturation after 18 of h post-insemination

Table 3

Variables of IVF in *in vitro* matured oocytes that were cultured in a medium with different concentrations of FTL and DXR during IVF after 18 h post-insemination

Fig. 1. Characteristics of oocyte chromatin configuration after 44 h of *in vitro* maturation.

A) oocyte matured in control medium with normal chromatin; B) oocyte with abnormal chromatin after maturation in presence of 60 µg/mL frutalin; C) oocyte with abnormal chromatin after culturing in a medium that contained doxorubicin

Table 1. Variables of IVM in pig COCs cultured in media for 44 h with different concentrations of FTL and DXR during IVM

Treatments	Total	Abnormal configuration	Oocyte chromatin configuration				MII (oocytes in MII)	Activated	Maturation Efficiency MII / total
			Meiotic resumption*	GVBD	MI				
	(n)	%	%	%	%	%	%	%	
Control	467	16.0 ^D (75/467)	90.56 ^A (355/392)	1.02 ^A (4/392)	34.95 ^A (137/392)	54.59 ^A (214/392)	-	45.82 ^A (214/467)	
0.6 FTL	305	21.3 ^D (65/305)	86.67 ^A (208/240)	2.92 ^{AB} (7/240)	31.25 ^A (75/240)	51.67 ^A (124/240)	0.83 ^A (2/240)	40.66 ^A (124/305)	
6 FTL	510	39.8 ^C (203/510)	87.62 ^A (269/307)	3.58 ^B (11/307)	9.45 ^B (29/307)	39.74 ^B (122/307)	34.85 ^B (107/307)	23.92 ^B (122/510)	
60 FTL	319	66.1 ^B (211/319)	40.74 ^B (44/108)	7.41 ^B (8/108)	-	18.52 ^C (20/108)	14.81 ^C (16/108)	6.27 ^C (20/319)	
DXR	357	95.5 ^A (341/357)	50.00 ^B (8/16)	-	-	25.00 ^{BC} (4/16)	25.00 ^{BC} (4/16)	1.12 ^D (4/357)	

^{A,B,C,D} Within a column, uncommon capital letters differed among treatments ($P < 0.05$).

* GVBD, MI, MII and activated oocytes.

Table 2. Variables of IVF in pig oocytes cultured in media with different concentrations of FTL and DXR during *in vitro* maturation after 18 of h post-insemination

Treatments	IVF parameters				
	Total n	Penetration %	Monospermy %	IVF Efficiency %	# SPZ / oocyte
Control	240	91.93 ^A (148/161)	25.00 ^A (37/148)	15.42 ^A (148/240)	3.33 ± 0.17 ^A
0.6 FTL	290	89.86 ^A (186/207)	23.66 ^A (44/186)	15.17 ^A (186/290)	3.11 ± 0.14 ^A
6 FTL	293	30.34 ^B (27/89)	66.67 ^B (18/27)	6.14 ^B (27/293)	1.37 ± 0.10 ^B
60 FTL	300	41.18 ^B (7/17)	71.45 ^{BC} (5/7)	1.67 ^C (7/300)	1.28 ± 0.18 ^{BC}
DXR	158	100.00 ^C (59/59)	33.90 ^{AC} (20/59)	12.66 ^A (46/158)	2.10 ± 0.18 ^C

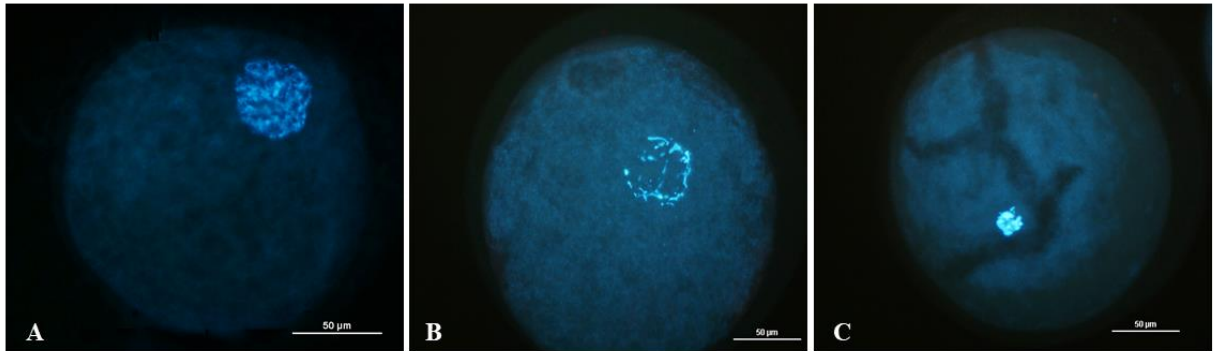
^{A,B,C} Distinct capital letters represent significant differences among treatments (P < 0.05).
n Total number of analyzed oocytes per treatment.

Table 3. Variables of IVF in *in vitro* matured oocytes that were cultured in a medium with different concentrations of FTL and DXR during IVF after 18 h post-insemination

Treatments	IVF parameters				
	Total n	Penetration %	Monospermy %	IVF Efficiency %	# SPZ / oocyte
Control	245	86/70 ^A (163/188)	27.61 ^A (45/163)	18.37 ^A (163/245)	2.95 ± 0.15 ^A
0.6 FTL	334	74.60 ^B (141/189)	63.12 ^B (89/141)	26.65 ^B (141/334)	1.56 ± 0.07 ^B
6 FTL	323	41.67 ^C (50/120)	86.00 ^C (43/50)	13.31 ^A (48/323)	1.18 ± 0.09 ^C
60 FTL	298	39.16 ^C (56/143)	87.50 ^C (49/56)	16.44 ^A (56/298)	1.12 ± 0.04 ^C
DXR	238	83.23 ^A (129/155)	34.88 ^A (45/129)	18.91 ^A (130/238)	2.50 ± 0.14 ^D

^{A,B,C,D} Distinct capital letters represent significant differences among treatments (P < 0.05).
n Total number of analyzed oocytes per treatment.

Fig. 1. Characteristics of oocyte chromatin configuration after 44 h of *in vitro* maturation. A) oocyte matured in control medium with normal chromatin; B) oocyte with abnormal chromatin after maturation in presence of 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ frutalin; C) oocyte with abnormal chromatin after culturing in a medium that contained doxorubicin



6 CONCLUSÕES GERAIS

1) A utilização de baixas concentrações de FTL (0,6 µg/mL) em meio de FIV reduz a incidência de polispermia, aumenta a eficiência da FIV e não apresenta efeitos nocivos sobre os oócitos em suínos durante a MIV e a FIV.

2) A frutalina, em altas concentrações (6 e 60 µg/mL) em meio de MIV ou FIV, promove alterações degenerativas na cromatina dos oócitos suínos durante a MIV e influência negativamente a FIV.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos no presente estudo abrem novas perspectivas para o uso da FTL em baixas concentrações em meio de FIV visando diminuir o índice de polispermia durante a FIV e melhorar a produção *in vitro* de embriões suínos. Estudos adicionais sobre os efeitos da FTL durante as etapas de produção *in vitro* de embriões suínos, bem como durante o desenvolvimento embrionário posterior são necessários para a utilização da frutalina nesta área.

8 REFERÊNCIAS

- ABEYDEERA, L. R.; DAY, B. N. In vitro penetration of pig oocytes in a modified Tris-buffered medium: effect of BSA, caffeine and calcium. **Theriogenology**; v.48, p.537–544, 1997.
- ABDON, A.P.V.; SOUZA, G.C.; SOUZA, L.N.C.; VASCONCELOS, R.P.; CASTRO, C.A.; GUEDES, M.M.; JÚNIOR, R.C.P.L.; MOREIRA, R.A.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; CAMPOS, A.R. Gastroprotective potential of frutalin, a d-galactose binding lectin, against ethanol-induced gastric lesions. **Fitoterapia**, v.83, p.604–608, 2012.
- ANDERSON, L.L. Suínos *In*: HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 6.ed. São Paulo: Editora Manole, p.348-364. 1995.
- ARLOTTO, T.; SCHWARTZ, J.L.; FIRST, N.L.; LEIBFRIED, M.L. Aspects of follicle and oocyte stage that affect in vitro maturation and development of bovine oocytes. **Theriogenology**, v.45, p.943-956, 1996.
- BATISTA, R.I.T.P.; MORO, L.N.; ALMINANA, E.C.C.; SOUZA-FABIAN, J.M.G.; FREITAS, V. J.F.; MERMILLOD, P. Combination of oviduct fluid and heparin to improve monospermic zygotes production during porcine in vitro fertilization. **Theriogenology**, v.86, p.495–502, 2016.
- BEN-YOSEF, D.; SHALGI, R. Oocyte activation: lessons from human infertility. **Trends Mol Med.**, v.7, p.163–169, 2001.
- BIASE, F.H.; EVERTS, R.E.; OLIVEIRA, R.; SANTOS-BIASE, W.K.F.; MERIGHE, G.K.F.; SMITH, L.C.; MARTELLI, L.; LEWIN, H.; MEIRELLES, F.V. Messenger RNAs in metaphase II oocytes correlate with successful embryo development to the blastocyst stage. **Zygote**, v.22, p.69-79, 2012.
- BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine oocyte meiotic inhibition before *in vitro* maturation and its value to *in vitro* embryo production: does it improve developmental competence? **Reprod Domest Anim.**, v.47, n.4, p.687-693, 2011.
- BYSKOV, A.G.; YDING-ANDERSEN, C.; HOSSAINI, A.; GUOLIANG, X. Cumulus cells of oocyte–cumulus complexes secrete a meiosis activating substance when stimulated with FSH. **Mol Reprod.**, v.46, p.296-305, 1997.
- BOUKANDOU, M.M.; MEWONO, L.; ABOUGHE, A.S. Toxicity studies of medicinal plants used in sub-Saharan Africa. **J. Ethnopharmacol**, v.4, p. 618–27, 2015.
- BLANCO, M.R.; DEMYDA, S.; MORENO MILLÁN, M.; GENERO, E. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: A review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.6, n.7, p.155-165, 2011.
- BRANDO-LIMA, A.C.; SALDANHA-GAMA, R.F.; PEREIRA, C.R.; VILLELA, C.G.; SAMPAIO, A.L.F.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; HENRIQUES, M.G.M.O.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase–

Akt and nuclear factor kappa-B pathways in the effect of frutalin on human lymphocyte. **International Immunopharmacology**, v.6, p.465–472, 2006.

BRANDO-LIMA, A.C.; SALDANHA-GAMA, R.F.; HENRIQUES, M.G.M.O.; MONTEIRO-MOREIRA, A.C.O.; MOREIRA, R.A.; BARJA-FIDALGO, C. Frutalin, a galactose-binding lectin, induces chemotaxis and rearrangement of actin cytoskeleton in human neutrophils: Involvement of tyrosine kinase and phosphoinositide 3-kinase. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.208, p.145-154, 2005.

BREVINI, T.L.; CILLO, F.; ANTONINI, A.; GANDOLFI, F. Cytoplasmic remodeling and the acquisition of developmental competence in pig oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.23-38, 2007.

CARVALHO, J.C.T. Fitoterápicos Anti-inflamatórios. Ribeirão Preto: **Tecmed**, 2015.

CAVALCANTE, M.D.E.S, et al. A panel of glycoproteins as candidate biomarkers for early diagnosis and treatment evaluation of B-cell acute lymphoblastic leukemia. **Biomarker Research**, p.4-1, 2016.

CONSTÂNCIO, A.P.N. Utilização da frutalina, uma lectina α -D-galactose ligante de *Artocarpus incisa* L., no estudo dos linfomas de Hodgkin forma clássica. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Curso de Pós-Graduação em Patologia, **Departamento de Patologia e Medicina Legal**, Universidade Federal do Ceará, 2005.

CONTI, E.; UY, M.; LEIGHTON, L.; BLOBEL, G.; KURIYAN, J. Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. **Cell**, v.2, p.193-204, 1998.

COTICCHIO, G.; DAL CANTO, M.; MIGNINI RENZINI, M.; GUGLIELMO, M.C.; BRAMBILLASCA, F.; TURCHI, D.; NOVARA, P.V.; FADINI, R. Oocyte maturation: gamete-somatic cells interactions, meiotic resumption, cytoskeletal dynamics and cytoplasmic reorganization. **Hum Reprod Update**, v.21, p.427–454, 2015.

COY, P.; CÁNOVAS, S.; MONDÉJAR, I.; SAAVEDRA, M.D.; ROMAR, R.; GRULLÓN, L. Oviduct-specific glycoprotein and heparin modulate sperm–zona pellucida interaction during fertilization and contribute to the control of polyspermy. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v.105, p.15809–14, 2008.

COY, P.; ROMAR, R. In vitro production of pig embryos: a point of view. **Reprod Fertil Dev.**, v. 14, p.275–86, 2002.

COX, J.F. Capacitacion espermatica para fertilizacion *in vitro* en ruminantes. Aspectos básicos y aplicados. Third symposium on advanced topics in animal reproduction. **Proceedings**, p.27-61, 1990.

CROCOMO, L.F.; MARQUE FILHO, W.C.; ULIAN, C.M.V.; BRANCHINI, N.S.; SILVA, D.T.; ACKERMANN, C.L.; LANDIM-ALVARENGA, F.C.; BICUDO, S.D. Effect of oil overlay on inhibition potential of roscovitine in sheep cumulus-oocyte complexes. **Reproduction in Domestic Animals**, v.50, p.40-416, 2015.

CUI, B.; LI, L.; ZENG, Q.; LIN, F.; YIN, L.; LIAO, L.; HUANG, M.; WANG, J. A novel lectin from *Artocarpus lingnanensis* induces proliferation and Th1/Th2 cytokine secretion through CD45 signaling pathway in human T lymphocytes. **J Nat Med.**, v.2, n.71, p. 409-421, 2017.

CUNHA, E.V.; COSTA, J.J.N.; ROSSI, R.O.D.S.; SILVA, A.W.B.; PASSOS, J.R.S.; PORTELA, A.M.L.R.; PEREIRA, D.C S.T.; DONATO, M.A.M.; CAMPELLO, C.C.; SARAIVA, M.V.A.; PEIXOTO, C.A.; SILVA, J.R.V.; SANTOS, R.P. Phytohemagglutinin improves the development and ultrastructure of in vitro-cultured goat (*Capra hircus*) preantral follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.4, p. 245-252, 2013.

DAMASCENO, M.B, et al. Frutalin reduces acute and neuropathic nociceptive behaviours in rodent models of orofacial pain. **Chemico-Biological Interactions**, v.256, p.9-15, 2016.

DEW, E.V. *In vitro* maturation of the canine oocyte. 56 f. Thesis (Master of sciences) – **University of Georgia**, 2001.

DODE, M.A.N.; RODOVALHO, N.C.; UENO, V.G.; FERNANDES, C.E. The effect of sperm preparation and time of co-incubation on in vitro fertilization of *Bos indicus* oocytes. **Animal Reproduction Science**, v.69, n.1-2, p.15-23, 2002.

DURANTTHON, V.; WATSON, A.J.; LONERGAN, A. Preimplantation embryo programming: trascription, epigenetics, and culture environment. **Reproduction**, v.135, n.2, p.141-150, 2008.

FAIR, T.; CARTER, F.; PARK, S.; EVANS, A.; LONERGAN, P. Global gene expression analysis during bovine oocyte in vitro maturation. **Theriogenology**, v.68, p.591–597, 2007.

FERREIRA, M.V.P. Frutalina, lectina a-D galactose ligante de *Artocarpus incisa* L: Um novo marcador celular no estudo da progressão tumoral no câncer de mama humano. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, 2001.

FERREIRA E.M.; VIREQUE A.A.; ADONA P.R.; MEIRELLES F.V. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: **Structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence**, v.71, p.836 –848, 2009.

FIGUEIREDO, J. R. Bioética: Repensando o uso das biotécnicas reprodutivas. **Cienc. Vet. Tróp.** 11, p. 116–118, 2008.

FIGUEIREDO, J. R. De; CELESTINO, J. J. D. H.; FAUSTINO, L. R.; RODRIGUES, A. P. R. *In vitro* culture of caprine preantral follicles: Advances, limitations and prospects. **Small Ruminant Research**, v. 98, n. 1–3, p. 192–195, 2011.

GALLEGO DEL SOL, F.; NAGANO, C.; CAVADA, B.S.; CALVETE, J.J. The first crystal structure of a Mimosoideae lectin reveals a novel quaternary arrangement of a widespread domain, **J. Mol. Biol.**, v.353, p.574-583, 2005.

GERRITSE, R.; BEERENDONK, C.; TIJINK, M.; HEETKAMP, A.; KREMER, J.; BRAAT, D.; WESTPHAL, J. Optimal perfusion of an intact ovary as a prerequisite for successful ovarian cryopreservation. **Hum. Reprod.**, v.23, p.329-35, 2008.

GIL, M.; ABEYDEERA, L.; DAY, B.; VAZQUEZ, J.; ROCA, J.; MARTINEZ, E.; Effect of the volume of medium and number of oocytes during in vitro fertilization on embryo development in pigs. **Theriogenology**, v.60, p.767-776, 2003.

GORDO, A.C.; HE, C.L.; SMITH, S.; FISSORE, R. A. Mitogen activated protein kinase plays a significant role in metaphase II arrest, spindle morphology, and maintenance of maturation promoting factor activity in bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v.59, p.106-114, 2001.

GORDON, I. Laboratory Production of Cattle Embryos. **Wallingford: CAB International**, p.640, 1994.

GONÇALVES, P.B.D.; VISINTIN, J.A.; OLIVEIRA, M.A.L.; MONTAGNER, M.M.; COSTA, L.F.S. Produção *in vitro* de Embriões. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEREDO J. R.; FREITAS, V. J. F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. 2.ed. São Paulo: Roca, p. 195-226, 2002.

GONÇALVES, R.F.; WOLINETZ, C.G.; BARNABE, V.H.; KILLIAN, G.J. Influence of osteopontin in bovine uterine tube fluid on sperm binding and fertilization in RCA-1 lectin-treated oocytes. **Reprod Domest Anim**, v.1, n.44, p.5-152, 2009.

GUPTA, S.K.; SRIVASTAVA, N.; CHOUDHURY, S.; RATH, A.; SIVAPURAPU, N.; GAHLAY, G.K.; BATRA, D. Update on zona pelúcida glycoproteins based contraceptive vaccine. **Journal of Reproductive Immunology**, v.62, p.79-89, 2004.

HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. Cromossomos X e Y: espermatozoides transportadores. In: HAFEZ, E.S.E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7.ed., São Paulo: Manole, p.395-398, 2004.

HAMATANI, T.; YAMADA, M.; AKUTSU, H.; KUJI, N.; MOCHIMARU, Y.; TAKANO, M.; TOYODA, M.; MIYADO, K.; UMEZAWA, A.; YOSHIMURA, Y. What can we learn from gene expression profiling of mouse oocytes? **Reproduction**, v.135, p.581-592, 2008.

HAN, C.; JIN, J. XU, S.; LIU, H.; LI, N.; CAO, X. Integrin CD11b negatively regulates TLR-triggered inflammatory responses by activating Syk and promoting degradation of MyD88 and TRIF via Cbl-b. **Nat. Immunol.**, p.11, v.734-742, 2010.

HAN, Y.M.; WANG, W.H.; ABEYDEERA, L.R.; PETERSEN, A.L.; KIM, J.H.; MURPHY, C.; DAY B.N.; PRATHER, R.S. Pronuclear location before the first cell division determines ploidy of polyspermic pig embryos. **Biol Reprod.**, v.61, n. 5, p.1340-6, 1999.

HARABAYASHI, J.; KUNO, A.; TATENO, H. Lectin-based structural glycomics: a practical approach to complex glycans. **Electrophoresis**, v.32, p.1118-1128, 2011.

HEDRICK, J.L. A comparative analysis of molecular mechanisms for blocking polyspermy: identification of a lectin-ligand binding reaction in mammalian eggs. **Reprod Fertil Suppl.**, v.63, p.409-19, 2007.

HOMA, S.T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, p.122-134, 1995.

JIANG, J.F.; HAN, Y.; XING, L.J.; XU, Y.Y.; XU, Z.H.; CHONG, K. Cloning and expression of a novel cDNA encoding a mannose-specific jacalin-related lectin from *Oryza sativa*. **Toxicon**, v. 47, p.133–139, 2006.

KLAFKE, G.B.; MOREIRA, G.M.S.G.; PEREIRA, J.L.; OLIVEIRA, P.D.; CONCEIÇÃO, F.R.; LUND, R.G.; GRASSMANN, A.A.; DELLAGOSTIN, O.A.; PINTO, L. S. 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.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L.; ALM, H.; TORNER, H.; HELLEIL, B.; TUCHSCHERER, A.R.B. Mitochondrial aggregation patterns and activity in in vitro cultured bovine oocytes recovered from early antral ovarian follicles. **Theriogenology**, v.75, p.662–670, 2011.

KHATAM, M.R.I.; SABBAG, M.R.P.H.; NIKRAVAN, N.; KHAZAEIPOUR, Z.; BOROUMAND, M.A.; SADEGHIAN, S.; DAVOUDI, B. The role of neutrophil-gelatinase-associated lipocalin in early diagnosis of contrast nephropathy. **Indian J Nephrol.**, v.25, p.292–296, 2015.

KIM, H.J.; LEE, S.J. Antibody-based enzyme-linked lectin assay (ABELLA) for the sialylated recombinant human erythropoietin present in culture supernatant. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, p.48, v.3, p.716–721, 2008.

KRISHER, R. L. The effect of oocyte quality on development. **J Anim Sci**, v.82, p.45-51, 2004.

LALWANI, A.K.; CAREY, T.E.; GOLDSTEIN, I.J.; PETERS, B.P. Lectin binding characteristics of squamous cell carcinomas of the head and neck. **Acta Otolaryngol**, v. 116, n.1, p.125-131, 1996.

LAM, S.K.; NG, T.B. Lectins: production and practical applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.89, n.1, p.45-55, 2011.

- LIU, S.; LI, Y.; GAO, X.; YAN, J.H.; CHEN Z.J. Changes in the distribution of mitochondria before and after *in vitro* maturation of human oocytes and the effect of *in vitro* maturation on mitochondria distribution. **Fertil Steril.**, v.93, p.1550–1555, 2010.
- LIN, J.; CHEN, F.; SUN, M.J.; ZHU, J.; LI, Y.W.; PAN, L.Z.; ZHANG, J.; TAN, J.H. The relationship between apoptosis, chromatin configuration, histone modification and competence of oocytes: A study using the mouse ovary-holding stress model. **Sci Rep.**, v.20, n.6, p.283-47, 2016.
- MAO, L.; LOU, H.; LOU, Y.; WANG, N.; JIN, F. Behaviour of cytoplasmic organelles and cytoskeleton during oocyte maturation. **Reprod Biomed.**, v.28, p.284–299, 2014.
- MEHLMANN, L. M. Oocyte-specific expression of Gpr3 is required for the maintenance of meiotic arrest in mouse oocytes. **Dev. Biol.**, v.288, p.397–404, 2005.
- MILHOME, M.V.L. Interação da frutalina com neoplasias de tireóide. Estudo comparativo com marcadores tumorais em uso. Tese (Doutorado em Bioquímica) - Curso de Pós-graduação em Bioquímica, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.
- MILHOME, M.V.L.; FERREIRA, F.V.A.; SCHMITT, F.C.L.; ROCHA FILHO, F.D.; MOREIRA, R.A. Frutalin alpha D galactose binding-lectin, antifrutalin rabbitt antibody (FTLrab), galectin3, CK19 and HBME1 as cyto and histological thyroid carcinoma markers. **Revista Médica do Paraná**, p. 62-94, 2004.
- MONTEIRO, A.C.O. Características químicas, físico-químicas e estruturais da frutalina: uma lectina D-galactose ligante de *Artocarpus incisa*, em Ceará/CE [dissertação]. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará/UFC; 1998.
- MONTEIRO-MOREIRA, A.C.; PEREIRA, H.D.; VIEIRA NETO, A.E.; MORENO, F.B.M.B.; LOBO, M.D.P.; SOUSA, F.D.; MOREIRA, R.A. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of frutalin, an -D-galactose-specific lectin from *Artocarpus incisa* seeds. **Acta Crystallographica**, v.7, p.1282-1285, 2015.
- MOREIRA, R.A.; AINOUS, I.L. Isolectins from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*) seeds. **Plant. Physiology**, p.61-118, 1978.
- MOREIRA, R.A.; CASTELO-BRANCO, C.C.; MONTEIRO, A.C.; TAVARES, R.O.; BELTRAMINI, L.M. Isolation and partial characterization of a lectin from *Artocarpus incisa* L. seeds. **Phytochemistry**, v.47, p.1183-1188, 1998.
- MUNN, C.; KISER, L.; WETZNER, S.; BAER, J. Ovary volume in young and premenopausal adults: US determination. Work in progress. **Radiology**. v.159, p.731–732, 1986.
- NAGAI, T.; MOOR, R.M. Effect of oviduct cells on the incidence of polyspermy in pig eggs fertilized *in vitro*. **Mol. Reprod. Dev.**, v. 26, p.377–381, 1990.

OLIVEIRA, C.; NICOLAU, A.; TEXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Cytotoxic Effects of Native and Recombinant Frutalin, a Plant Galactose-Binding Lectin, on HeLa Cervical Cancer Cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.16-10, 2011.

OLIVEIRA, C.; FELIX, W.; MOREIRA, R.A.; TEXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Expression of frutalin, an α -d-galactose-binding jacalin-related lectin, in the yeast *Pichia pastoris* protein expression and purification. **Protein Expression and Purification**, v.60, p.188–193, 2008.

OLIVEIRA, C.; TEXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Recombinant production of plant lectins in microbial systems for biomedical application – the frutalin case study. **Frontiers in Plant Science**, v.5, p.390, 2014.

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, J.A.; SCHMITT, F. DOMINGUES, L. A comparative study of recombinant and native frutalin binding to human prostate tissues. **BMC Biotechnology**, p.9-78, 2009.

PEREIRA, C.; et al. Involvement of AKT and NFkappa-B on lymphocyte activation by frutalin, a galactose-binding lectin. Nitric Oxide. **Cytokines and inflammation-An International Symposium**, v.95, p.1072-1081, 2004.

PEREIRA, H.M.; et al. Crystal Structure of Frutalin from *Artocarpus incisa*. **Protein Data Bank**, v.227, p.292-293, 2015.

PEUMANS, W.J.; ZHANG, W.; BARRE, A.; ASTOUL, C.H.; BALINT-KURTI, P.J.; ROVIRA, P.; ROUGÉ, P.; MAY, G.D.; VAN LEUVEN, F.; TRUFFA-BACHI, P.; VAN DAMME, E.J.M. Fruit-specific lectins from banana and plantain. **Planta**, v.211, n.4, p.546- 554, 1998.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M. Lectins as plant defense proteins. **Plant Physiology**, v.109, n.2, p.347-352, 1995.

PEUMANS, W.J.; VAN DAMME, E.J.M.; BARRE, A.; ROUGE, P. Classification of plant lectins in families of structurally and evolutionary related proteins. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.491, p.27-54, 2001.

PENG, X.R.; HSUEH, A.J.; LAPOLT, P.S.; BJERSING, L.N.Y.T.; Localization of luteinizing hormone receptor Messenger ribonucleic acid expression in ovarian cell types during follicle development and ovulation. **Endocrinology**, v.129, p.3200-3207, 1991.

PICTON, H., BRIGGS, D., GOSDEN, R.; The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.145, p.27-37, 1998.

PORTELA, A.M.L.R.; RIBEIRO, R.P.; COSTA, J.J.N.; ROSSI, R.O.D.S.; PASSOS, J.R.; VASCONCELOS, G.L.; DONATO, M.A.M.; PEIXOTO, C.A.; SARAIVA, M.V.A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R.V. Effects of different concentrations of concanavalin A and follicle stimulating hormone on goat primordial follicles activation, survival and gene expression., **Zygote**, v.43, p.28-34, 2014.

PRUNIER, A.; QUESNEL, H. Nutritional influences on the hormonal control of reproduction in females pigs. **Livest. Prod. Sci.**, v. 63, p.1–16, 2000.

RIBEIRO, R.P.; PORTELA, A.M.; SILVA, A.W.; COSTA, J.J.; PASSOS, J.R.; CUNHA, E.V.; SOUZA, G.B.; SARAIVA, M.V.; DONATO, M.A.; PEIXOTO, C.A.; VAN DEN HURK, R.; SILVA, J.R. Effects of jacalin and follicle stimulating hormone on in vitro goat primordial follicle activation, survival and gene expression. **Zygote**, v.537, n.4, p.49, 2015.

ROMAR, R.; FUNAHASHI, H.; COY, P. *In vitro* fertilization in pigs: New molecules and protocols to consider in the forthcoming years. **Theriogenology**, v.85, p.125-134, 2016.

ROTH, Z.; HANSEN, P.J. Disruption of nuclear maturation and rearrangement of cytoskeletal elements in bovine oocytes exposed to heat shock during maturation. **Reproduction**, v.129, p.235-244, 2005.

SAGATA, N. What does Mos do in oocytes and somatic cells? **Bioessays**, v.19, p.13-21, 1997.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.1896-1912, 2012.

SANTOS, R.R.; SCHOEVERS, E.J.; ROELEN, B.A. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. **Reprod Biol Endocrinol**, v.12, p.117, 2014.

SCHOEPPNER, H.L.; RAZ, A.; HO, S.B.; BRESALIER, R.S. Expression of an endogenous galactose-binding lectin correlates with neoplastic progression in the colon. **Cancer**, v.75, n.12, p.2818-26, 1995.

SHARON, N.; LIS, H. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. **Glycobiology**, v.14, n.11, p.53–62, 2004.

SILVA, W.J.; et al. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresour. Technol.**, v.99, n.3, p.251-325, 2008.

SOARES, M.A.; COSTA, J.J.; VASCONCELOS, G.L.; RIBEIRO, R.P.; SOUZA, J.C.; SILVA, A.L.; VAN DEN HURK R.; SILVA, J.R. Effects of frutalin on early follicle morphology, ultrastructure and gene expression in cultured goat ovarian cortical tissue. **Histol Histopathol.**, v.15, p.11-88, 2018.

SUAREZ, S.S. Interactions of spermatozoa with the female reproductive tract: inspiration for assisted reproduction. **Reprod Fertil Dev.**, v.19, n.103–10, 2007.

TANABE, M.; TAMURA, H.; TAKETANI, T.; OKADA, M.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; ASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. **J. Reprod.**, v. 61, p.35-41, 2015.

TORNER, H.; GHANEM, N.; AMBROS, C.; HÖLKER, M.; TOMEK, W.; PHATSARA, C.; ALM, H.; SIRARD, M.A.; KANITZ, W.; SCHELLANDER, K.; *et al.* Molecular and subcellular characterisation of oocytes screened for their developmental competence based on glucose-6-phosphate dehydrogenase activity. **Reproduction**, v.135, p.197–212, 2008.

TOKARSKA-SCHLATTNER, M.; WALLIMANN, T.; SCHLATTNER, U. New insights into doxorubicin-induced cardiotoxicity: the critical role of cellular energetics. **Biologies.**, v.329, p.657–668, 2006.

THOMAS, R. E.; THOMPSON, J.G.; ARMSTRONG, D. T.; GILCHRIST, R. B. Effect of specific phosphodiesterase isoenzyme inhibitors during *in vitro* maturation of bovine oocytes on meiotic and developmental capacity. **Biol Reprod.**, v.9, p.71:1142, 2004.

TROUNSON, A. The derivation and potential use of human embryonic stem cells. **Reprod Fertil Dev**, v.13, p.523-532, 2001.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

VAN DAMME, E.J.M.; COOSSENS, K.; SMEETS, K.; LEUVEN, F.V.; VERHAERT, P.; PEUMANS, W.J. The major tuber storage protein of araceae species is a lectin. Characterization and molecular cloning of the lectin from *Arum maculatum* L. **Plant Physiology**, v.107, n. 4, p.1147-58, 1995.

VAN DAMME, E.J.M.; PEUMANS, W.J.; BARRE, A.; ROUGE, P. Plant lectins : a composite of several distinct families of structurally and evolutionary related proteins with diverse biological roles. **Critical reviews in plant sciences**, v.17, p.575-692, 1998.

WALLS, M.L.; HUNTER, T.; RYAN, J.P.; KEELAN, J.A.; NATHAN, E.; HART, R.J. *In vitro* maturation as an alternative to standard *in vitro* fertilization for patients diagnosed with polycystic ovaries: a comparative analysis of fresh, frozen and cumulative cycle outcomes. **Hum Reprod.**, v.1, n.30, p.88-96, 2015.

WANG, W.H.; UCHIDA, M.; NIWA, K. Effects of follicle cells on *in vitro* penetration of pig oocytes by cryopreserved, ejaculated spermatozoa. **J Reprod Dev.**, v.38, p.125–131, 1992.

WANG, S.; PANTER, K.E.; EVANS, R.C.; BUNCH, T.O. The effects of pokeweed mitogen (PWM) and phytohemagglutinin (PHA) on bovine oocyte maturation and embryo development *in vitro*. **Anim Reprod Sci.**, v.67, n.3, p.20-215, 2001.

WATSON, A.J. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, v.85, n.13, p.E1E3, 2007.

WEHREND, A.; MEINECKE, B. Kinetics of progression, M-phase promoting factor (MPFP and mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) activities during *in vitro*

maturation of porcine and bovine oocytes: species specific differences in the length of the meiotic stages. **Anim Reprod.** v.66, p.175-84, 2001.

VIEIRA NETO, A.E. Caracterização estrutural da frutalina, uma lectina a-D-galactose ligante de sementes de *Artocarpus incisa* e análise das suas bases moleculares de ligação a D-galactose, em Ceará/CE [dissertação]. Ceará: Universidade Federal do Ceará/UFC; 2015.

YAU, T.; DAN, X.; CHARLENE CHEUK WING, C.C.; BUN, T. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. **Molecules**, v. 20, p.3791-3810, 2015.

YAMADA, M.; ISAJI, Y. Structural and functional changes linked to, and factors promoting, cytoplasmic maturation in mammalian oocytes. **Reprod Med Biol.**, v.10, p.69-79, 2011.

YONEZAWA, N.; AMARI, S.; TAKAHASHI, K.; IKEDA, K.; IMAI, F.L.; KANAI, S.; KIKUCHI, K.; NAKANO, M. Participation of the nonreducing terminal b-galactosyl residues of the neutral N-linked carbohydrate chains of porcine zona pellucida glycoproteins in sperm-egg binding. **Mol Reprod Dev.**, v.70, p.222–227, 2005.

ZHANG, P.; ZHANG, Y.; DOU, H.; YIN, J.; CHEN, Y.; PANG, X.; et al. Handmade cloned transgenic piglets expressing the nematode fat-1 gene. **Cell Reprogram**, v.114, p.258–66, 2012.

ZHANG, D.L.; LU, C.H.; YU, D.H.; WANG, Z.Y. Characterization and functional analysis of a tandem-repeat galectin-9 in large yellow croaker *Larimichthys crocea*. **Fish and Shellfish Immunology**, v.26, n.3, p.3791-810, 2016.