

Toxicidade *in vitro* da *Niedenzuella (Tetrapteryx) multiglandulosa* em embriões bovinos

In vitro toxicity of *Niedenzuella (Tetrapteryx) multiglandulosa* on bovine embryos

Valquíria Bull¹ , Ana Carolina Leite¹ , Ana Flávia Machado Botelho^{2*} , Rayanne Henrique Santana da Silva¹ , Eliane Beatriz Magalhães Silva¹ , Benito Soto-Blanco¹ , Anelise de Carvalho Nepomuceno¹ , Alan Maia Borges¹ , Marília Martins Melo¹ 

¹Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

²Universidade Federal de Goiás (UFG), Goiânia, Goiás, Brasil

*Correspondente: anaflaviamabo@gmail.com

Resumo

Niedenzuella (Tetrapteryx) multiglandulosa, uma videira encontrada no Brasil, tem sido correlacionada a surtos de intoxicações em bovinos e búfalos, gerando perdas econômicas relacionadas à morte por insuficiência cardíaca, aborto, natimorto e mortalidade neonatal. O objetivo deste estudo foi examinar o potencial embriotóxico do extrato vegetal aquoso em embriões bovinos *in vitro*. O estudo *in vitro* foi realizado em cinco repetições de cultura de embriões bovinos distribuídos em dois grupos: controle, meio de cultura de embriões *in vitro* sem o extrato aquoso da planta; grupo tratado, com adição de 2,7mg / mL de extrato vegetal aquoso (10%) à cultura do embrião no sexto dia de cultivo. A taxa de clivagem foi avaliada no dia 2 da cultura de células. Viabilidade, eclodibilidade e subdesenvolvimento de blastocistos no sétimo, oitavo e nono dia (D7, D8 e D9, respectivamente) de cultura foram avaliados em microscópio estereoscópico. No dia 7, os blastocistos foram submetidos ao ensaio TUNEL para determinar o índice apoptótico. Observamos redução significativa da produção de blastocisto / número de embriões clivados (60,6% vs 41,5%); redução da produção de blastocistos / número total de oócitos bovinos maturados (35,1% vs 21,3%); e taxas de eclosão embrionária (38,0% vs 10,0%). No entanto, nenhum efeito foi observado na taxa de apoptose. Em conclusão, o extrato aquoso das folhas de *N. multiglandulosa* reduz a viabilidade do embrião bovino *in vitro*, sugerindo possíveis efeitos prejudiciais no desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: apoptose; blastocisto; planta tóxica.

Abstract

Niedenzuella (Tetrapteryx) multiglandulosa, a vine plant found in Brazil, has been correlated to outbreaks of poisoning in cattle and buffaloes, generating economic losses related to the death due to heart failure, miscarriage, abortion, stillbirth, and neonatal mortality. The aim of this study was to examine the embryotoxic potential of the aqueous plant extract on *in vitro* bovine embryos. *In vitro* study was performed in five replicates of bovine embryo culture assigned in two groups: control, *in vitro* embryo culture medium without the aqueous plant extract; treated group, with addition of 2.7mg/mL of aqueous plant extract (10%) to the embryo culture on the sixth day of culture. Cleavage rate was evaluated at day 2 of the cell culture. Viability, hatchability and underdevelopment of blastocysts on the seventh, eighth, and ninth days (D7, D8, and D9, respectively) of culture were assessed under stereoscopic microscope. On day 7, blastocysts were submitted to TUNEL assay to determine apoptotic index. *In vitro* exposure of bovine embryos to of *N. multiglandulosa* resulted in reduced embryo development and survival, evaluated by dark cytoplasm indicating poor morphology and poor quality with marked reduction of hatchability. We observed a significant reduction of blastocyst production/number of cleaved embryos (60.6% vs 41.5%); reduction of blastocysts production/total number of matured bovine oocytes (35.1% vs 21.3%); and embryonic hatching rates (38.0% vs 10.0%). However, no effects were observed on the apoptotic rate. In conclusion, aqueous extract of *N. multiglandulosa* leaves reduces bovine embryo viability *in vitro*, suggesting possible detrimental effects on embryo development.

Key words: apoptosis; blastocyst; toxic plant.

Recebido: 4 de fevereiro de 2022. Aceito: 5 de maio de 2022. Publicado: 27 de maio de 2022.



Introdução

Niedenzuella (Tetrapteryx) multiglandulosa (A. Juss.) W. R. Anderson é uma planta tóxica da família Malpighiaceae encontrada nas regiões Sudeste e Centro-Oeste do Brasil⁽¹⁾. O consumo espontâneo de folhas da *Niedenzuella* vem sendo associado a surtos de mortalidade, aborto, bezeros recém nascidos fracos, e falência cardíaca no gado^(2,3), e a intoxicação frequentemente ocorre na estação seca devido à falta de foragens alternativas^(3,4). Efeitos toxicológicos prejudiciais são frequentemente associados a outras causas, principalmente infecciosas. Perdas embriogênicas e abortos são um problema sério que resulta em considerável perda econômica para a indústria de carne bovina, e a eficácia das medidas de controle requerem diagnóstico acurato. Infelizmente, apenas 30% dos casos chegam a um diagnóstico etiológico definitivo, considerando que muitos agentes, infecciosos ou não, podem estar envolvidos^(5,6). Pesquisas experimentais prévias determinaram que ovelhas também podem ser susceptíveis⁽⁷⁾.

N. multiglandulosa também induz aborto em diferentes momentos da gestação e a ingestão da planta em fase de prenhez tardia resulta em natimortos ou nascimento de prole fraca^(3,4,8). Os efeitos da planta durante os estágios iniciais do desenvolvimento embriogênico permanecem desconhecidos, pois estudos prévios foram realizados no terço médio ou final da prenhez^(4,8). Em um surto que ocorreu em 2004 no Brasil, aproximadamente 80% de 290 vacas prenhas que haviam sido introduzidas em um pasto altamente infestado por *N. multiglandulosa* apresentaram aborto ou pariram bezeros fracos que morreram alguns dias após o nascimento, indicando que a substância tóxica pode ultrapassar barreiras placentárias⁽⁹⁾. Na verdade, o aborto ainda é o aspecto prejudicial mais comumente reportado na intoxicação espontânea por *N. multiglandulosa*⁽³⁾.

Apesar do potencial tóxico ao trato reprodutivo feminino, nós ainda não identificamos o mecanismo de ação dos compostos da *N. multiglandulosa*. Todas as partes da planta são tóxicas, como folhas jovens e maduras de *N. multiglandulosa* têm heterosídeos flavônicos, polifenóis, esteróides, e glicosídeos cardiotônicos. Além disso, taninos e alcalóides quartenários foram apenas encontrados em folhas maduras⁽¹⁰⁾. Outro estudo isolou e identificou 19 diferentes compostos das folhas, incluindo alcalóides, flavonoides glicosilados e não-glicosilados, outros compostos glicosilados e seis esteroides (orecdisteróides)⁽¹¹⁾.

Os efeitos de um agente tóxico do desenvolvimento embriogênico e fetal dependem da sua natureza, dosagem, estágio de desenvolvimento, e fatores que modificam a toxicidade, como o genótipo (espécie/raça), ambiente materno, e a placenta. O período de desenvolvimento entre a fertilização e a implantação do embrião no útero e

subsequente organogênese é conhecida como pré-implantação, um estágio muito sensível à injúria que pode determinar a morte embrionária ou completa recuperação do desenvolvimento embriogênico⁽¹²⁾. Testagem da sensibilidade dos embriões a agentes químicos no período pré-implantação é essencial para determinar o seu potencial de induzir a letalidade embrionária. No entanto, existem poucos protocolos experimentais que estudaram a possível toxicidade de químicos a embriões bovinos.

Alternativamente, modelos *in vitro* vêm sendo utilizados como novas abordagens na abordagem da toxicologia reprodutiva⁽¹³⁾, principalmente em mulheres expostas a determinados agentes tóxicos que podem causar efeito temporário negativo na qualidade de oócitos^(14,15). Durante a maturação, oócitos são susceptíveis a alterações epigenéticas interferindo na fertilização e desenvolvimento embrionário precoce. A possibilidade de uso de material bovino obtido em frigorífico para testes *in vitro* relacionados a gametas e desenvolvimento embrionário precoce parecem uma importante ferramenta para diminuir o número de testes *in vivo*⁽¹⁵⁾, e o uso de oócitos de bovinos fornecem informações sobre as possibilidades de avaliação de químicos na maturação de oócitos *in vitro*, fertilização e desenvolvimento embriogênico precoce (estágio de preimplantação)^(15,16).

Apesar dos numerosos relatos dos efeitos da intoxicação *in vivo* por *N. multiglandulosa*, a toxicidade direcionada ao sistema reprodutor continua incerta. Baseado em estudos prévios usando animais vivos e tentando replicar a mesma menor concentração tóxica da planta (0,002mg do extrato de planta/ μ L de sangue) que apresentava efeitos deletérios no trato reprodutivo de cabras⁽⁴⁾ e coelhas⁽¹⁷⁾, o objetivo deste estudo foi determinar o efeito embriotóxico do extrato aquoso de folhas de *N. multiglandulosa* usando embriões bovinos *in vitro* como modelo.

Materiais e métodos

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CEUA) sob o protocolo 388/2016.

N. multiglandulosa (Malpighiaceae) foi cultivada e colhida no Campo de Plantas Tóxicas da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil. Um espécime voucher foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica (Herbário BHCB), Instituto de Ciências Biológicas, sob o número BHCB 38051.

O extrato foi obtido a partir de 77g da planta, composto por 60% de folhas maduras, 24% de folhas jovens e 16% de brotos, a mesma proporção de diferentes partes das plantas utilizadas anteriormente em estudos realizados *in vivo* com intoxicação em caprinos⁽⁴⁾ e coelhos⁽¹⁷⁾. Folhas e brotos foram triturados em

liquidificador com 500mL de etanol absoluto (>99%). O material resultante foi deixado em repouso em um recipiente fechado por quatro dias em temperatura ambiente com reposição diária de álcool. A solução de álcool foi filtrada e concentrada em um evaporador rotativo a 65°C a 80 rpm sob vácuo para formar um extrato seco pesando 4,216g. Em seguida, 100mL de água destilada foram adicionados ao extrato e levados ao banho ultrassônico por 15 minutos para aumentar a extração dos constituintes fitoquímicos da planta. Posteriormente, o extrato aquoso foi separado por filtração usando um filtro de papel qualitativo. O extrato aquoso foi fracionado com 50mL de acetato de etila em um funil de separação. Após a descarga da fração de acetato de etila, o extrato aquoso remanescente foi fracionado mais duas vezes com 70mL de acetato de etila. O acetato de etila residual no extrato aquoso foi removido em um evaporador rotativo a 65°C a 100 rpm. A solução aquosa foi então fracionada três vezes com 50mL de butanol saturado em água em um funil de separação. O extrato aquoso foi novamente concentrado no evaporador rotativo a 68°C a 100 rpm, produzindo 1,545g de resíduo marrom seco. A temperatura utilizada no processamento laboratorial para obtenção do extrato foi baseada em estudos anteriores publicados^(18,19,20). Um total de 27mg do extrato da planta foi diluído em 1mL de Meio Fluido de Oviduto Sintético (SOFaa) para testes *in vitro*.

Ovários bovinos (n = 403) foram obtidos em abatedouro local e os folículos foram aspirados para obtenção de oócitos para produção *in vitro* de embriões. Foram realizadas cinco rotinas de cultivo *in vitro* de embriões, considerando cada rotina como uma repetição e para cada repetição foram utilizadas cinco a seis replicatas. Todos os procedimentos para produção de embriões *in vitro* foram baseados em Leite et al.⁽²¹⁾. Resumidamente, pequenos folículos ovarianos contendo oócitos imaturos foram puncionados para obter complexos cumulus-oócitos (COCs). Os COCs imaturos foram submetidos à maturação *in vitro* (IVM) por 24 horas em meio à base de bicarbonato TCM-199 (Gibco® Life Technologies, Grand Island, EUA). Oócitos maduros circundados por um cumulus expandido foram submetidos à fertilização *in vitro* (FIV) por co-incubação com espermatozoides em meio FERT-TALP por cerca de 18 horas. O dia da adubação foi considerado dia zero (D0). Após a FIV, os zigotos presumidos foram cultivados *in vitro* em meio SOFaa até D9.

No primeiro dia (D1), os zigotos foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de cinco a seis gotas de cultura (réplicas) de meio de cultura para cada tratamento, contendo 15 a 20 estruturas em cada gota. O Grupo 1 (controle) foi composto por zigotos que receberam apenas meio de cultura de embrião (SOFaa), e o Grupo 2 recebeu extrato aquoso de *N. multiglandulosa* no sexto dia (D6). Um total de 7µL (10%) de meio de cultura *in vitro* foi removido e substituído por 7µL de extrato vegetal aquoso

(compreendendo 0,2mg de extrato de *N. multiglandulosa*/ 70µL de gota de cultura), previamente diluído em meio SOFaa. No dia dois (D2) de cultura, a taxa de clivagem (número de zigotos clivados por número total de COCs) foi avaliada. No sexto dia (D6), foram avaliadas as taxas de produção de embriões/número total de oócitos e produção de embriões/número total de zigotos clivados e viabilidade embrionária. O número de embriões produzidos, viabilidade e eclodibilidade de todos os blastocistos foram avaliados no sétimo, oitavo e nono dias de cultivo (D7, D8 e D9, respectivamente). Para viabilidade, avaliou-se a cinética do desenvolvimento embrionário, considerando o estágio de desenvolvimento esperado no dia da avaliação e comparando os grupos. A taxa de eclosão foi considerada pela capacidade dos embriões em crescimento de romper a zona pelúcida durante D7, D8 e D9. No D7, em média, três blastocistos (nove blastocistos por grupo) foram removidos de cada tratamento para fixação em solução de formalina a 4% para ensaio TUNEL (Promega® Corporation, Wisconsin, EUA) de acordo com as instruções do fabricante para determinação do índice apoptótico. As amostras foram observadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. O número total de células foi obtido pela observação das células coradas por Hoechst, que foram visualizadas em azul com filtro de 460nm. As células (blastômeros) em apoptose foram identificadas por fluoresceína, resultando em coloração verde e observadas com filtro de 520±20nm. O índice apoptótico foi calculado a partir da razão entre o número total de células e o número de células apoptóticas, utilizando o programa IMAGEJ (Versão 1.42e, 2008).

Os dados foram submetidos aos testes de Kolmogorov-Smirnov e Cochran-Bartlett para normalidade e homoscedasticidade, respectivamente. Taxa de clivagem, produção de blastocisto/clivado, produção de blastocisto/número total de oócitos em cultura, taxa de eclosão e taxas de apoptose celular foram avaliadas pelo teste exato de Fisher usando o software GraphPad Instat 3.0. O nível de significância foi estabelecido em 5%.

Resultados

Os efeitos de *N. multiglandulosa* na produção de blastocistos em D7 são mostrados na Tabela 1. A taxa de clivagem não diferiu entre os grupos experimentais (58% vs 51%), indicando que os oócitos apresentavam qualidade semelhante antes do início da produção de embriões. No entanto, a produção de embriões, de acordo com o número total de oócitos e o número de embriões clivados, foi significativamente reduzida após o tratamento com *N. multiglandulosa*. A taxa de eclosão também foi significativamente menor no grupo tratado. As taxas de eclosão embrionária foram de 38,0% (38/100) e 10,0% (6/60), para os grupos controle e extrato de *N. multiglandulosa*, respectivamente.

Tabela 1. Produção de blastocistos bovinos relativos ao número de embriões clivados, e produção de blastocistos relativos ao número total de oócitos bovinos maturados *in vitro* após cultura de extrato aquoso de *N. multiglandulosa*

Grupos	Número total de oócitos	Taxa de produção de embriões/ clivados (n) (%)	Taxa de produção de embriões/ número total de oócitos	Taxa de ecodibilidade
			n (%)	n (%)
Controle	404	142/234 ^a (60,68%)	142/404 ^a (35,14%)	38/100 ^a (38,0%)
Extrato <i>N. multiglandulosa</i>	427	91/219 ^b (41,55%)	91/427 ^b (21,31%)	6/60 ^b (10,0%)

^{a,b} Valores na mesma coluna seguidos de letras sobrescritas diferem entre si pelo teste exato de Fisher com 5% de significância.

Além disso, os embriões do grupo extrato de *N. multiglandulosa* apresentaram morfologia ruim (citoplasma escuro) e qualidade inferior aos do grupo controle (Figura 1).

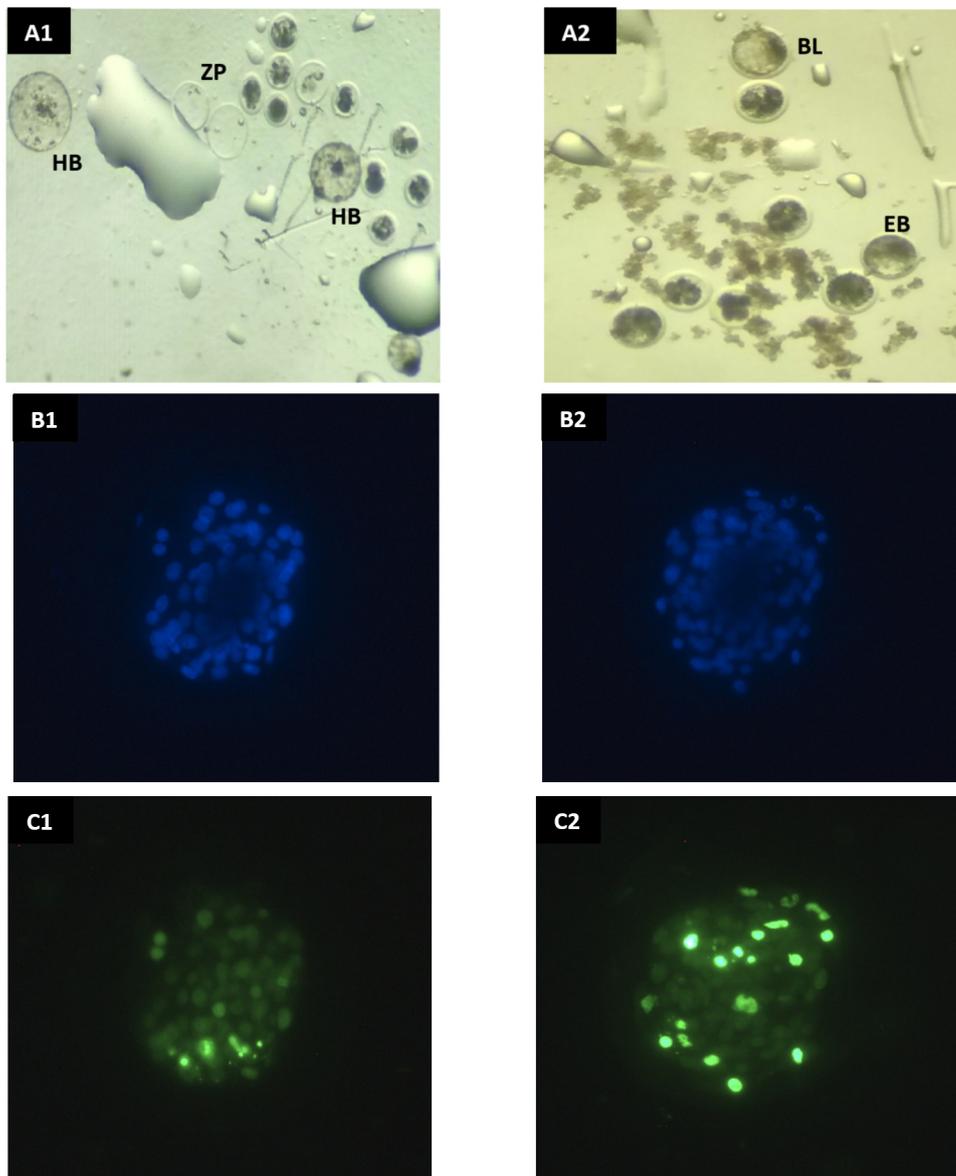


Figura 1. Embriões bovinos produzidos *in vitro* no dia 9 de cultivo. A1, B1 e C1: Grupo Controle; A2, B2 e C2: extrato aquoso de *N. multiglandulosa*; HB: blastocisto eclodido; EB: blastocisto precoce; BL: blastocisto; ZP: zona pelúcida após a eclosão do embrião (estereomicroscópico com aumento de 40X). B e C: Avaliação da apoptose de embriões bovinos *in vitro* (microscópio de fluorescência com aumento de 400X). B1 e B1: Total de células embrionárias bovinas coradas com Hoechst (azul) (filtro 460nm). B2 e C2: células verdes brilhantes (TUNEL) em apoptose (filtro 520±20nm).

O extrato aquoso de *N. multiglandulosa* não causou apoptose significativa de células embrionárias, pois o número de células apoptóticas e a taxa apoptótica

permaneceram inalterados, conforme mostrado na Figura 1 e na Tabela 2.

Tabela 2. Número total e número de células em apoptose \pm desvio padrão, e taxa apoptótica (%) de células de embriões bovinos produzidos *in vitro* nos grupos controle e extrato aquoso de *N. multiglandulosa*

Grupos	Número total de células	Número de células em apoptose	Frequência de apoptose (%)
Controle	46,66 \pm 14,41	3,33 \pm 3,00	7,22 \pm 7,20
Extrato <i>N. multiglandulosa</i>	65,20 \pm 26,03	4,80 \pm 4,10	7,80 \pm 7,12

As médias do número total e do número de células em apoptose não diferiram. A taxa de apoptose não mostrou diferença significativa. Teste exato de Fisher com 5% de significância.

Discussão

Com base em estudos anteriores do nosso grupo usando animais vivos, e tentando replicar a mesma concentração mais baixa de planta tóxica (0,002mg de extrato vegetal/ μ L de sangue) que teve efeitos prejudiciais no trato reprodutivo de cabras gestantes⁽⁴⁾ e coelhas⁽¹⁷⁾, propusemos testar uma dose única de extrato de planta (0,002mg de extrato de planta/ μ L de meio de cultura *in vitro*) para replicar a mesma concentração usada naqueles ensaios *in vivo*. Para atingir a concentração exata da planta tóxica nos baseamos nos métodos de Melo et al.⁽⁴⁾ que testaram duas diferentes concentrações (10 e 20g/kg de peso corporal) de folhas de *N. multiglandulosa*. A concentração final de 0,2mg de extrato aquoso de *N. multiglandulosa*/70 μ L no meio de cultura embrionária foi relacionada à menor dose (10mg/Kg PC ou 380g de folhas verdes/cabra/dia) que teve efeitos reprodutivos negativos em cabras Saanen (média de 38kg de peso corporal). *N. multiglandulosa* apresentou 35% de matéria seca e os animais ingeriram, em média, 133g/dia de matéria seca (MS). Salienta-se que 1g de MS da planta equivale a 57,3mg de extrato, e 133g/dia x 57,3mg = 7.620,9mg de extrato (ingestão diária de extrato pelas cabras). Para caprinos com peso médio de 38kg (cabra = 38.000.000g) = 7.620,9mg de extrato por 38.000.000mg de PC = 0,0002 x 100 = ingestão de 0,02% do peso vivo em extrato. As cabras têm 8 a 10% do PC no sangue (3,04 a 3,80L de sangue) e 7.620,9mg de extrato em 3.000mL de sangue (3.000.000 μ L de sangue) = 0,002mg de extrato vegetal/ μ L de sangue. Os mesmos cálculos foram realizados pelo Bull⁽¹⁷⁾ utilizando coelhas prenhes (média de 3kg de PV; ingerindo 10,5g/dia de MS das plantas; 240 a 300mL de sangue; 0,002mg de extrato vegetal/ μ L de sangue).

Para o estudo *in vitro* no presente trabalho, usamos os mesmos cálculos. O extrato foi obtido a partir de 77g da planta (77g de planta verde x 35% de MS = 26,95g de MS) que fornece 1.545mg de extrato, e foram utilizados 27mg de extrato que foi diluído em 1.000 microlitros de meio de cultura de embrião = 27 mg/1.000 μ L = 0,027 mg/microlitro de meio. 0,027mg/ μ L x 7 μ L que foi removido e recolocado em gota de cultura do meio de

cultura (= 0,189 mg de extrato em 7 μ L). Uma gota de meio de cultura embrionário = 7 μ L do extrato + 63 μ L de meio de cultura = 70 μ L (10% do volume final). 0,189mg de extrato em gotas de 70 μ L do meio de cultura de embrião = 0,002mg/ μ L de meio de cultura. Finalmente, a mesma concentração de extrato vegetal foi usada para esses três ensaios diferentes usando cabras⁽⁴⁾, coelhos⁽¹⁷⁾ e bovinos produzidos *in vitro* embriões no presente estudo.

O dia 6 de cultivo foi escolhido para adicionar o extrato aquoso de *N. multiglandulosa* com base no estudo anterior de Melo et al.⁽⁴⁾ que encontraram sinais precoces de toxicidade embrionária que acabaram levando à diminuição dos batimentos cardíacos, morte fetal, aborto, necrose de coagulação placentária e apoptose de células binucleares no epitélio trofoblástico, placentite e necrose de coagulação das áreas carunculares. Na produção de embriões *in vitro*, a diferenciação celular precoce (massa celular interna e formação de trofoblastos) ocorre em embriões por volta do dia 6 (blastocistos iniciais), e a diferenciação trofoblástica, responsável pela formação da placenta, é encontrada seis dias após a fertilização *in vitro*.

A ingestão de folhas de *N. multiglandulosa* induz aborto em diferentes fases da gestação, causando também natimortos ou nascimento de filhotes fracos^(3,4,8). No entanto, pouco se sabe sobre seus possíveis efeitos no desenvolvimento embrionário inicial. O resultado final do desenvolvimento embrionário inicial anormal é a morte e reabsorção, que geralmente não é detectada na clínica médica ou se apresenta como síndrome da vaca repetidora de cio induzida por estradiol⁽²²⁾. O extrato de *N. multiglandulosa* foi tóxico durante os estágios iniciais da embriogênese bovina, pois causa subdesenvolvimento e baixa eclodibilidade dos embriões. Esses resultados sugerem que a planta tem potencial para promover morte embrionária e reabsorção em bovinos, semelhante ao relatado em ratos após a ingestão de *Ateleia glazioviana*⁽²³⁾.

Em condições naturais, a massa celular interna do embrião apresenta maior índice apoptótico, com baixa proporção no trofocotoderma, que regula a população celular e remove o excesso de células danificadas, desnecessárias ou comprometidas no desenvolvimento na

fase de blastocisto⁽²⁴⁾. Em embriões bovinos morfológicamente normais, a apoptose ocorre a partir do estágio de 9-16 células e, na fase de mórula, 50% dos embriões apresentam pelo menos um núcleo em apoptose durante a análise de TUNEL. Blastocistos com menos de 100 células apresentam taxa apoptótica de 0-10%, caindo para 0-6% naqueles com mais de 100 células⁽²⁴⁾. No presente estudo, o extrato afetou o desenvolvimento embrionário inicial, conforme verificado pela menor produção *in vitro* de embriões bovinos. No entanto, o mecanismo de ação ainda é incerto. O aumento da apoptose na patogênese da disfunção placentária também foi estudado em cabras gestantes envenenadas experimentalmente com *N. multiglandulosa*. A apoptose intensa durante a fase inicial da gravidez pode ser prejudicial para o desenvolvimento normal e função da placenta e pode ajudar a explicar a morte fetal e aborto observado após a ingestão de *N. multiglandulosa*⁽²⁵⁾.

Toxinas, incluindo as fitotoxinas, podem induzir estresse oxidativo nas células e causar danos ao comprometer o DNA ou componentes proteicos e lipídicos^(26,27). Além disso, os efeitos na respiração mitocondrial induzida pela hipóxia e as alterações na homeostase do cálcio reduzem os níveis de ATP, comprometendo o desenvolvimento embrionário inicial e aumentando a perda celular *in vivo* e *in vitro*⁽²⁶⁾. Embriões com maior celularidade e viabilidade têm maior chance de implantação no útero⁽²⁸⁾. Embriões com desenvolvimento tardio e menor poder de eclosão da zona pelúcida apresentam características degenerativas nos estágios iniciais da divisão do blastômero, impedindo seu desenvolvimento posterior. Este resultado pode ser verificado pela diferença entre os embriões do grupo extrato aquoso de *N. multiglandulosa*, que são morfológicamente escurecidos e de baixa qualidade quando comparados ao grupo controle, podendo prejudicar o sucesso da transferência embrionária e inviabilizar a gestação em condições *in vivo*.

A composição química do extrato das folhas de *N. multiglandulosa* foi previamente estudada por Russo et al.⁽¹¹⁾ realizando um fracionamento usando MPLC-UV, e depois uma purificação mais precisa usando HPLC preparativa. Dezenove substâncias foram isoladas como alcalóides, flavonóides glicosilados e não glicosilados, compostos glicosilados e seis esteróides (também chamados de ecdisteróides), incluindo um novo ecdisteróide que foi identificado e elucidado por UHPLC-TOF-HRMS e RMN. As substâncias isoladas foram identificadas como: trigonelina, triptofano, 4-hidroxicinamamida, ácido p-cumárico 4-O-β-D-glicopiranosídeo, icarisídeo F2, luteoforol, ácido (E)-4-hidroxicinâmico, (Z)-4-hidroxicinâmico ácido, integristerona A, epicdisterona, kaempferol triglicosídeo ecdisterona, isorhamnetina triglicosídeo, ácido cinâmico, multiglandysterona, calonisterona e podecdisona B.

Certamente, todas as ferramentas de diagnóstico - estudos de campo, sinais clínicos, patologia macro e microscópica, bem como identificação química de plantas e toxinas vegetais em amostras de animais - são essenciais para fazer um diagnóstico preciso, desenvolver estratégias de manejo intervenientes e melhorar o desempenho reprodutivo^(29,30).

O resultado do estudo *in vitro* sugere que o extrato aquoso de *N. multiglandulosa* pode prejudicar a reprodução, muitas vezes silenciosamente, por danificar embriões em estágio inicial causando subdesenvolvimento, baixa capacidade de eclosão da zona pelúcida e possivelmente morte embrionária precoce. Assim, mais estudos são necessários para investigar os efeitos prejudiciais da *N. multiglandulosa* nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário. Este é o primeiro estudo preliminar usando um sistema de produção de embriões *in vitro* e sabemos que o conhecimento deste extrato é importante, e que mais trabalhos devem ser feitos dando continuidade a esta pesquisa. O presente estudo estabelece um modelo *in vitro* novo e prático para estudar o efeito de plantas tóxicas na reprodução de ruminantes.

Os efeitos prejudiciais de produtos químicos e tóxicos na fertilidade feminina foram testados usando modelos animais *in vitro* principalmente com oócitos de bovinos e suínos^(14,15,31,32); como uma possibilidade de estudar um modelo para humanos. Os modelos *in vitro* vêm aumentando uma vez que o uso de animais para fins científicos está diminuindo nas pesquisas. Esses estudos estão se concentrando no efeito de toxinas e toxinas reprodutivas na maturação *in vitro* de oócitos, fertilização e estágio de pré-implantação de embriões iniciais. A qualidade dos oócitos é prejudicada quando as mulheres são expostas a agentes tóxicos durante a maturação⁽¹⁴⁾, e se o oócito não seguir uma via apoptótica⁽¹⁵⁾, ainda há o risco de afetar a fertilização e o desenvolvimento embrionário subsequente, uma vez que os oócitos são suscetíveis a alterações epigenéticas⁽³²⁾. Danos às células embrionárias e placentárias leva ao desenvolvimento e função anormais da placenta e pode explicar a morte fetal e o aborto observado após a ingestão de *N. multiglandulosa*⁽²⁵⁾.

Conclusão

Em conclusão, a exposição *in vitro* de embriões bovinos a 2,7mg/mL de extrato aquoso de *N. multiglandulosa* causou uma redução acentuada no desenvolvimento embrionário e eclodibilidade, sugerindo que a planta pode causar danos aos embriões quando a exposição ocorre nos estágios iniciais da gestação. Além disso, o experimento confirma que embriões bovinos produzidos *in vitro* podem ser usados para investigar a toxicidade das plantas.

Declaração de conflito de interesses

Nenhum dos autores do manuscrito acima declarou qualquer conflito de interesse.

Contribuições dos autores

Conceituação: M.M. Melo, A.M.Borges; **Curadoria de dados:** V. Bull, R.H.S.da Silva, A.C. Leite, E.B.M.Silva, A.C. Nepomuceno, A.F.M. Botelho; **Gerenciamento do projeto:** M. M. Melo; **Análise formal:** A.F.M.Botelho, B. Soto-Blanco, A.C. Nepomuceno; **Redação (esboço original):** V. Bull, A.F.M.Botelho, A.M.Borges, B.Soto-Blanco, M.M.Melo. **Redação (revisão e edição):** A.F.M.Botelho, A.M.Borges, M.M.Melo.

Informações de financiamento

Autores gostariam de agradecer a FAPEMIG, CNPq e CAPES.

Referências

- Mamede MCH, Sebastiani R, Almeida RF, Francener A, Amorim A. Malpighiaceae: lista de Espécies da Flora do Brasil [online]. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro; 2015. <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB155> [Acessado em 30 november 2017].
- Tokarnia CH, Peixoto PV, Döbereiner J, Consorte IB, Gava A. *Tetrapteryx* spp. (Malpighiaceae), a causa de mortandades em bovinos caracterizadas por alterações cardíacas. Pesquisa Veterinária Brasileira. 1989;9, 23-44.
- Carvalho NM, Alonso LA, Cunha NG, Ravedutti, J, Barros CSL, Lemos RAA. Intoxicação de bovinos por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em Mato Grosso do Sul. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2006;6, 139-146.
- Melo MM, Vasconcelos AC, Dantas GC, Serakides R, Alzamora F. Experimental intoxication of pregnant goats with *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. (Malpighiaceae). Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2001;53, 58-65.
- Kirkbride CA. Etiologic agents detected in a 10-year study of bovine abortions and stillbirths. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 1992;4, 175-180.
- Jamaluddin, AA, Case JT, Hird DW, Blanchard PC, Peauroi JR, Anderson ML. Dairy cattle abortion in California: evaluation of diagnostic laboratory data. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1996;8, 210-218.
- Riet-Correa G, Terra FF, Schild AL, Riet-Correa F, Barros SS. Intoxicação experimental por *Tetrapteryx multiglandulosa* (Malpighiaceae) em ovinos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2005;25, 91-96.
- Riet-Correa G, Riet-Correa F, Schild, AL, Barros SS, Soares MP. Abortion and neonatal mortality in sheep poisoned with *Tetrapteryx multiglandulosa*. Veterinary Pathology. 2009;46, 960-965.
- Peixoto PV, Caldas SA, França TN, Peixoto TC, Tokarnia CH. Chronic Heart Failure and Abortion Caused by *Tetrapteryx* spp. in Cattle in Brazil. In: RIET-CORREA, F. et al. (Eds.). Poisoning by plants, mycotoxins, and related toxins. [s.l.] CAB International: London, 2011. p. 256-263.
- Melo MM, Dantas-Barros AM. Triagem fitoquímica preliminar da *Tetrapteryx multiglandulosa* A. Juss. (Malpighiaceae). Revista Brasileira de Toxicologia. 1999.v.12, p.55-62.
- Russo HM, Nunes WDG, Da Silva BV, Ionashiro M, Caires FJ. Thermo analytical and spectroscopic characteristics of young and old leaves powder and methanolic extracts of *Niedenzuella multiglandulosa*. Journal of Thermal Analysis and Calorimetry. 2018;132: 771-776.
- Hood RD, Rousseaux CG, Blakley PM. Embryo and fetus. In: Haschek, WM, Rousseaux CG, Wallig MA. Editors. Handbook of Toxicologic Pathology, Cambridge: Academic Press; 2002.pp. 895-936.
- Piersma AH, Bosgra S, van Duursen MB, Hermsen SA, Jonker LR, Kroese E.D, van der Linden SC, Man H, Roelofs MJ, Schulpen SH, Schwarz M, Uibel F, van Vugt-Lussenburg BM, Westerhout J, Wolterbeek AP, van der Burg B. Evaluation of an alternative in vitro test battery for detecting reproductive toxicants. Reprod Toxicol 2013; 38:53-64.
- Woudenberg AB, Gröllers-Mulderij M, Snel C, Jeurissen N, Stierum R, Wolterbeek A. The bovine oocyte in vitro maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. Reproductive Toxicology. 2012; 34:251-260.
- Santos RR, Eric J Schoevers EJ, Roelen BAJ. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. Reproductive Biology and Endocrinology. 2014; 12:117-128.
- Lorenzetti S, Altieri I, Arabi S, Balduzzi D, Bechi N, Cordelli E, Galli C, Letta F, Modina SC, Narciso L, Pacchierotti F, Villani P, Galli A, Lazzari G, Luciano AM, Paulesu L, Spano M, Mantovani A. Innovative non-animal testing strategies for reproductive toxicology: the contribution of Italian partners within the EU project ReProTect. Annali dell'Istituto Superiore di Sanità. 2011; 47:429-444.
- Bull V. Efeito da *Niedenzuella multiglandulosa* em coelhas gestantes e em embriões bovinos produzidos *in vitro*. 2018. 57f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade Federal de Minas Gerais.
- Borboleta LR, Labarrere CR, Ribeiro AFC, Paes Leme FO, Paes PRO, Ocarino NM, Melo MM. Perfil bioquímico sanguíneo na intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (A. Juss.) Griseb. (Malpighiaceae) em coelhos. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2011;63:1113-1123.
- Pedroza H P, Ferreira, MG, Melo KDA, Carvalho JG, Keller KM, Melo MM, Soto-Blanco B. Concentrações de oleandrina nas folhas de *Nerium oleander* de diferentes cores da floração. Ciência Rural. 2015; 45:864-866
- Botelho AFM, Santos-Miranda A, Joca HC, Mattoso CRS, Oliveira MS, Pierezan F, Cruz JS, Soto-Blanco B, Melo MM. Hidroalcolic extract from *Nerium oleander* L. (Apocynaceae) elicits arrhythmogenic activity. Journal of Ethnopharmacology, 2017;12:170-177.
- Leite AC, Andrade VB, Silva EBM, Borges AM. Efeito da adição do ácido linoleico conjugado no cultivo *in vitro* de embriões F1 Holandês x Zebu na sobrevivência pós-vitrificação. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2017;69 (6): 1385-1392.
- Panter KEE, Stegelmeier BL. Effects of xenobiotics and phytochemicals on reproduction in food animals. Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. 2011;27: 429-446.
- Langeloh, A, Leguizán F, Dalsenter P. Potencial abortivo e infertilizante de plantas brasileiras contaminantes ocasionais de pastagens de bovinos e outros herbívoros de interesse econômico. Pesquisa Veterinária Brasileira. 1992; 12:11-18.
- Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. Analysis of

apoptosis in the preimplantation bovine embryo using TUNEL. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1999; 117:97-105.

25. Campos PP, Vasconcelos AC, Melo MM. Apoptose no placentomo de cabras gestantes intoxicadas experimentalmente com cipó-preto – *Tetrapteryx multiglandulosa*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2004;56:19-24.

26. McConkey DJ. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicological Letters*, 1998;99:157-168.

27. Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radical Biology & Medicine*. 2000; 28, 463-499.

28. Van Soom A, Ysebaert M, De Kruif A. Relationship between timing of development, morula morphology and cell allocation to the inner cell mass and trophectoderm in *in vitro* produced embryos. *Molecular Reproduction and Development*. 1997; 47: 47-56.

29. Stegelmeier BL, Davis TZ, Clayton MJ. Plant-induced reproductive disease, abortion, and teratology in livestock. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2020; 36(3):735-743. doi: [10.1016/j.cvfa.2020.08.004](https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2020.08.004).

30. Buroni F, Gardner DR, Boabaid FM, Oliveira LGS, de Nava G, López F, Riet-Correa F. Spontaneous abortion in cattle after consumption of *Hesperocyparis (Cupressus) macrocarpa* (Hartw.) Bartel and *Cupressus arizonica* (Greene) needles in Uruguay. *Toxicol*. 2020 Jul 15;181:53-56. doi: [10.1016/j.toxicol.2020.04.104](https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2020.04.104). Epub 2020 Apr 28. PMID: 32353569.

31. Campagna C, Ayotte P, Sirard MA, Arsenault G, Laforest JP, Bailey JL. Effect of an environmentally relevant metabolized organochlorine mixture on porcine cumulus-oocyte complexes. *Reproductive Toxicology*. 2007; 23:145–152.

32. Sirard MA. Factors affecting oocyte and embryo transcripts. *Reproduction Domestic Animals*. 2012; 47:148-155.