

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Jean Mussoi Weigert

**ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS DO *SENECIO* SPP. MODULAM A  
EXPRESSÃO GÊNICA DE INTERFERON TAU E DE GENES DO  
ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN*  
*VITRO***

Santa Maria, RS  
2022

Jean Mussoi Weigert

**ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS DO *SENECIO* SPP. MODULAM A EXPRESSÃO GÊNICA DE INTERFERON TAU E DE GENES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientador: Prof. Dr. Valério Marques Portela Jr.

Santa Maria, RS  
2022

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Weigert, Jean  
ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS DO SENECIO SPP. MODULAM A  
EXPRESSÃO GÊNICA DE INTERFERON TAU E DE GENES DO  
ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS IN  
VITRO / Jean Weigert.- 2022.  
65 p.; 30 cm

Orientador: Valério Marques Portela Jr.  
Coorientador: Alfredo Quitês Antoniazzi  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2022

1. Interferon Tau 2. Alcalóides pirrolizidínicos 3.  
Desenvolvimento embrionário inicial 4. Intoxicação por  
planta I. Marques Portela Jr., Valério II. Quitês  
Antoniazzi, Alfredo III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, JEAN WEIGERT, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

**Jean Mussoi Weigert**

**ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS DO *SENECIO* SPP. MODULAM A EXPRESSÃO GÊNICA DE INTERFERON TAU E DE GENES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO***

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de concentração em Sanidade e Reprodução Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 17 de março de 2022.



---

**Valério Marques Porfela Júnior, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)



---

**Adriano Tony Ramos, Dr. (UFSC)**



---

**Alessandra Bridi, Dr. (USP)**

Santa Maria, RS.  
2022

## AGRADECIMENTOS

À Deus, à Nossa Senhora e a todos que abençoam nosso caminho, para enfrentarmos as dificuldades e seguirmos em frente, crescendo pessoalmente e profissionalmente.

Aos meus pais, Rogério e Eunice, por estarem sempre presentes e me apoiando na minha trajetória acadêmica.

À minha vó, Eunice, por sempre me apoiar e incentivar a estudar e crescer profissionalmente.

Ao meu tio-avô, “Niti”, uma pessoa muito especial que sempre ajudou a todos, fazendo tudo que estava ao seu alcance, sempre com sorriso no rosto. Infelizmente ele não está mais entre nós, mas tenho a certeza de que, onde ele estiver, ele continua com o mesmo sorriso no rosto protegendo e cuidando de nós, para que nossa vida seja “*Cada vez melhor*”, como ele gostava de dizer.

À Jessica e sua família por todo apoio, carinho, amizade, confiança e compreensão.

Aos meus amigos pela amizade e pelos momentos bons que passamos juntos.

À toda minha família pelo apoio, atenção, carinho e amor.

Ao meu orientador professor Valério Marques Portela Jr. pelos ensinamentos, amizade, paciência e dedicação.

Ao meu coorientador professor Alfredo Quites Antoniazzi pelos ensinamentos, apoio e por toda ajuda neste período conturbado de pandemia.

Aos colegas do BioRep, pela amizade e pelo apoio, tornando possível nosso desenvolvimento pessoal e profissional.

À secretária do PPGMV, Maria Moro da Rosa pelo auxílio e apoio.

Aos órgãos de fomento CNPq, CAPES, FAPERGS e FINEP pelo apoio financeiro para tornar possível as pesquisas e experimentos que realizamos diariamente nos laboratórios.

Ao frigorífico El’Golli pela cessão dos ovários.

## RESUMO

### ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS DO *SENECIO* SPP. MODULAM A EXPRESSÃO GÊNICA DE INTERFERON TAU E DE GENES DO ESTRESSE OXIDATIVO EM EMBRIÕES BOVINOS PRODUZIDOS *IN VITRO*

AUTOR: Jean Mussoi Weigert  
ORIENTADOR: Valério Marques Portela Jr.

A senecionina (SN, do inglês: senecionine) e a senecifilina (SP, do inglês: seneciphylline) são membros dos alcalóides pirrolizidínicos (PAs, do inglês: pyrrolizidine alkaloids), família de compostos que são encontrados em muitas espécies de plantas em todo o mundo, entre elas, *Senecio* spp. são as plantas tóxicas mais importantes que afetam a pecuária no sul do Brasil. Os PAs contidos em *Senecio* spp. tornam-se tóxicos quando são biotransformados pela ação da enzima citocromo P450 (CYP450, do inglês: cytochrome P450). Nossa hipótese é que os PAs causam efeitos nas células ovarianas e embriões bovinos, sendo responsáveis por reduções significativas no desempenho reprodutivo e produtividade dos bovinos. Para esclarecer essa questão, nosso objetivo foi investigar os genes relacionados ao interferon tau (*IFNT*), estresse oxidativo e sobrevivência celular sob influência de SN e SP na produção *in vitro* de embriões. Complexos cumulus-oócitos (COCs) bovinos foram maturados sob influência de PAs, fertilizados e cultivados sem PAs (grupos IVM); ou COCs foram maturados e fertilizados sem PAs, e os zigotos cultivados sob influência de PAs (grupos IVC). No dia 7, os PAs não afetaram os embriões tratados durante a maturação (grupos IVM), exceto na expressão de *IFNT* (tratamento SP;  $P < 0.05$ ). No entanto, o tratamento com PAs (especialmente SN) durante o cultivo *in vitro* (grupos IVC) afetou não apenas a expressão de *IFNT*, mas também a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e sobrevivência celular ( $P < 0.05$ ). Concluímos que, os PAs podem estar modulando a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e sobrevivência celular em embriões, prejudicando a expressão de *IFNT* e comprometendo o desenvolvimento embrionário inicial durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** Interferon tau. Alcalóides pirrolizidínicos. Desenvolvimento embrionário inicial. Intoxicação por planta.

## ABSTRACT

### **PYRROLIZIDINE ALKALOIDS FROM *SENECIO* SPP. MODULATE GENE EXPRESSION OF INTERFERON TAU AND OXIDATIVE STRESS RELATED GENES IN BOVINE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO***

AUTHOR: Jean Mussoi Weigert  
ADVISOR: Valério Marques Portela Jr.

Senecionine (SN) and seneciphylline (SP) are members of the pyrrolizidine alkaloid (PA), family of compounds that are found in many plant species worldwide, among them, *Senecio* spp. They are the most important toxic plants affecting cattle in southern Brazil. The PAs contained in *Senecio* spp. become toxic when they are biotransformed by the action of the cytochrome P450 enzyme (CYP450). We hypothesize that PAs cause effects on ovarian cells and bovine embryos, being responsible for significant decreases in cattle reproductive performance and productivity. To clarify this matter, we aimed to investigate interferon tau (*IFNT*), oxidative stress and cell survival related genes under SN and SP influence on *in vitro* embryo production. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were matured under PAs conditions, fertilized, and cultured without PAs conditions (IVM groups); or COCs were matured and fertilized without PAs conditions and the zygotes were cultured under PAs conditions (IVC groups). On day 7, PAs did not alter embryos that were poisoned during COCs maturation, except in *IFNT* expression (SP treatment;  $P < 0.05$ ). However, PAs (especially SN) poisoning during IVC affect not only *IFNT*, but also oxidative stress and cell survival genes expression ( $P < 0.05$ ). In conclusion, the PAs could be modulating the expression of oxidative stress and cell survival genes in embryos, impairing the expression of *IFNT* and compromising the early embryo development during *in vitro* bovine embryo culture.

**Keywords:** Interferon tau. Pyrrolizidine alkaloids. Early embryo development. Plant intoxication.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 – Estrutura química dos alcalóides pirrolizidínicos.....14
- FIGURA 2 – Características estruturais mínimas para a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos: 1) um anel 3-pirrolina; 2) um ou dois grupamentos hidroxilas ligados ao anel pirrolina; 3) um ou dois grupamentos esterificados; e 4) uma cadeia ramificada no resíduo ácido.....15
- FIGURA 3 – Corpo lúteo de uma vaca prenhe que apresenta células luteínicas grandes com megalocitose (seta). Células luteínicas grande normal (cabeça de seta). Podem ser observadas células luteínicas pequenas normais (seta vazada) e capilares (\*). Corada em hematoxilina-eosina (HE). Barra = 20µm. Lente Obj. 40X.....16
- FIGURA 4 – Desenvolvimento embrionário inicial em ruminantes.....18
- FIGURA 5 – Mecanismo de ação parácrina do interferon tau durante o reconhecimento materno de gestação em bovinos.....20
- FIGURA 6 – Mecanismo de ação parácrina e endócrina do IFNT durante o reconhecimento materno da gestação.....21

### CAPÍTULO 1

- FIGURE 1 - Relative mRNA expression of cytochrome P450 (CYP1A1) in granulosa cells (GC), theca cells (TC) and bovine embryos (EB). Bars represent the group mean  $\pm$  SEM.....52
- FIGURE 2 - Percentage of cleavage rates of bovine embryos produced in vitro (day 2) under SN (a) and SP conditions (c) during oocyte maturation; and percentage of blastocyst rates of bovine embryos produced in vitro under SN (b) and SP conditions (d) during oocyte maturation (IVM groups), evaluated 7 days after in vitro fertilization.....53
- FIGURE 3 - Percentage of cleavage rates of bovine embryos produced in vitro (day 2) under SN (a) and SP conditions (c) during oocyte fertilization and embryo culture; and percentage of blastocyst rates of bovine embryos produced in vitro under SN (b)



and SP conditions (d) during oocyte fertilization and embryo culture (IVC groups), evaluated 7 days after in vitro fertilization. Different letters indicate statistical significance among groups ( $P < 0.05$ ).....54

FIGURE 4 - Relative mRNA expression of IFNT2 genes on bovine embryos produced in vitro (day 7;  $n = 8$  embryos/group) under SN (a) and SP conditions (b) during IVM from all IVM groups; and under SN (c) and SP conditions (d) during in vitro fertilization and embryo culture from all IVC groups. Bars represent the group mean  $\pm$  SEM for five replicates. Different letters indicate statistical significance among groups ( $P < 0.05$ ).....55

FIGURE 5 - Relative mRNA expression of genes associated with oxidative stress on bovine embryos produced in vitro (day 7;  $n = 8$ ) under SN (a-d) and SP conditions (e-h) during oocyte maturation (IVM groups). (a) CAT, (b) GPX, (c) SOD1, (d) SOD2, (e) CAT, (f) GPX, (g) SOD1, and (h) SOD2. Bars represent the group mean  $\pm$  SEM for five replicates.....56

FIGURE 6 - Relative mRNA expression of genes associated with oxidative stress on bovine embryos produced in vitro (day 7;  $n = 8$ ) under SN (a-d) and SP conditions (e-h) during oocyte fertilization and embryo culture (IVC groups). (a) CAT, (b) GPX, (c) SOD1, (d) SOD2, (e) CAT, (f) GPX, (g) SOD1, and (h) SOD2. Bars represent the group mean  $\pm$  SEM for five replicates. Different letters indicate statistical significance among groups ( $P < 0.05$ ).....57

FIGURE 7 - Relative mRNA expression of gene associated with cellular stress HSP90AA1 (HSP90) on bovine embryos produced in vitro (day 7;  $n = 8$ ) under SN (a) and SP conditions (b) during oocyte maturation (IVM groups), and under SN (c) and SP conditions (d) during oocyte fertilization and embryo culture (IVC groups). Bars represent the group mean  $\pm$  SEM for five replicates. Different letters indicate statistical significance among groups ( $P < 0.05$ ).....58

## LISTA DE TABELAS

TABLE 1 – Primers designed for quantitative real-time PCR analysis.....	51
---	----

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
2.1	IMPACTO DO <i>SENECIO BRASILIENSIS</i> EM BOVINOS .....	13
2.2	ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS .....	14
<b>2.2.1</b>	<b>Alcalóides pirrolizidínicos na reprodução animal</b> .....	16
2.3	RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO .....	17
<b>2.3.1</b>	<b>Ações do interferon tau</b> .....	19
2.4	ESTRESSE OXIDATIVO.....	22
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO 1</b> .....	24
<b>4</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	59
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	60

## 1 INTRODUÇÃO

A intoxicação por plantas do gênero *Senecio* é considerada a principal intoxicação por plantas e representa importante causa de morte em bovinos, com grande repercussão econômica na região sul do Brasil (BARROS et al., 2007; GRECCO et al., 2010). Essa intoxicação ocorre pela ingestão de *Senecio* spp., em especial o *Senecio brasiliensis* que é a espécie mais disseminada no Brasil e responsável pela grande maioria dos casos de intoxicação espontânea em bovinos. Considerada uma planta daninha nativa da América do Sul, está amplamente distribuída na região sul do Brasil e encontrada no Uruguai, Argentina e Paraguai (KISSMANN; GROTH, 2000; LORENZI, 2008).

A toxicidade das espécies de *Senecio* deve-se à presença de alcalóides hepatotóxicos pertencentes ao grupo das pirrolizidinas que ao serem quebrados em grupos pirróis, pela ação da enzima citocromo P450 (CYP450), são capazes de produzir lesão crônica e irreversível, caracterizada pela inibição da mitose celular. Além disso, os alcalóides pirrolizidínicos (PAs) são as principais citotoxinas presentes em diferentes concentrações em muitas plantas, entre as quais *Senecio* spp. representam o maior risco para os bovinos e, por sua vez, para os consumidores dos produtos de origem animal (BANDYOPADHYAY et al., 2009). Estimativas apontam que no mínimo 5% do rebanho bovino brasileiro morrem anualmente (MÉNDEZ; RIET-CORREA, 2008) e dados de laboratórios de diagnóstico mostram que 10.6-14% desses casos devem-se à intoxicação por plantas (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). De acordo com o IBGE (2016) o efetivo bovino na região sul conta com cerca de 28 milhões de cabeças. Se considerarmos que 5% dos bovinos morrem anualmente, chegamos ao número de 1.4 milhão de cabeças mortas por ano na região sul sendo que, em torno de 196 mil (14%) animais mortos por plantas tóxicas. Estima-se que 50% destas mortes são atribuídas a seneciose e dessa forma, chegamos à conclusão de que aproximadamente 98 mil animais morrem em decorrência da intoxicação por *Senecio* spp. (RIET-CORREA; MEDEIROS, 2001). De acordo com os dados supracitados, conclui-se que somente na região sul do Brasil perde-se 24.5 milhões de dólares por ano devido a intoxicação por *Senecio* spp. Perdas essas que podem ser muito maiores se considerarmos os animais com intoxicação crônica subclínica, causando reduções nas taxas de produção de carne, leite e a queda nos índices reprodutivos. Acredita-se que a causa das baixas taxas reprodutivas dos animais intoxicados por *Senecio* spp. são geradas pelas lesões hepáticas que, por sua vez, contribuem com a perda de peso e a baixa condição nutricional dos animais intoxicados. Porém, os resultados da pesquisa de Krabbe et al. (2015) indicam que a intoxicação por *Senecio* spp. pode levar a subfertilidade por ação direta dos PAs sobre as células ovarianas

e no desenvolvimento embrionário inicial bovino. Essa descoberta nos conduziu a acreditar que a intoxicação por *Senecio* spp. pode levar a subfertilidade por ação direta dos PAs sobre as células ovarianas e no desenvolvimento embrionário inicial bovino.

O reconhecimento materno da gestação em ruminantes ocorre entre os dias 10-20 de gestação, quando o concepto sinaliza para a mãe a sua presença (BAZER et al., 1986). O interferon tau (IFNT) é a principal citocina responsável pela interação embrião-mãe para evitar a luteólise, estabelecer e manter a gestação (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999; NISWENDER et al., 2000). O IFNT é produzido pelo trofoblasto embrionário durante o período pré-implantação e atua no útero de forma parácrina, inibindo a expressão de receptores endometriais de estrógeno e ocitocina no epitélio luminal, evitando pulsos luteolíticos de prostaglandina F2 alfa (PGF) (SPENCER; BAZER, 1996). Além disso, a ação do IFNT foi identificada em tecidos extrauterinos (HAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008) para proteger o corpo lúteo contra pulsos de PGF (ANTONIAZZI et al., 2013; BOTT et al., 2010).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) medeia o estresse oxidativo e, a citotoxicidade dos PAs pode causar dano e estresse oxidativo por meio da geração de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (BANDYOPADHYAY et al., 2009). ROS participam de diversas funções biológicas. No entanto, processos patológicos podem ocorrer quando houver desequilíbrio entre a produção de ROS e a capacidade antioxidante celular (SLIMEN et al., 2014; SOYSAL et al., 2017). ROS intracelulares aumentados podem causar danos mitocondriais e ao DNA (SLIMEN et al., 2014), levando a autofagia e morte celular (BOVERIS; CHANCE, 1973; KIFFIN et al., 2004).

Pesquisas demonstram que qualquer fonte de estresse tem o potencial de interromper o processo de interação entre o útero e o embrião (THATCHER; MEYER; DANET-DESNOYERS, 1995), consequentemente comprometendo o estabelecimento e manutenção da gestação. Portanto, o estresse oxidativo causado pelos PAs pode estar diretamente relacionado à diminuição das taxas de fertilidade e ao desenvolvimento embrionário inicial.

Nossa hipótese é que os PAs afetam o desenvolvimento embrionário inicial bovino e as células ovarianas, comprometendo a produção de IFNT pelo embrião e causando desequilíbrio na produção de ROS, consequentemente comprometendo o reconhecimento materno, estabelecimento e manutenção da gestação. Os objetivos deste estudo foram: 1) avaliar o desenvolvimento embrionário inicial sob efeito dos PAs durante a maturação, e durante a fertilização e cultivo embrionário inicial *in vitro*; 2) demonstrar a influência dos PAs na expressão de *IFNT* e genes relacionados ao estresse oxidativo; 3) investigar os efeitos dos PAs

sobre a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e ao desenvolvimento embrionário inicial.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 IMPACTO DO *SENECIO BRASILIENSIS* EM BOVINOS

O gênero *Senecio* possui em torno de 1.500 espécies sendo 60 destas encontradas principalmente nas regiões Sul e Sudeste do Brasil (OLIVEIRA; SILVA; TELES, 2015; ROMO-ASUNCIÓN et al., 2016). Destaca-se que no Rio Grande do Sul são encontradas 24 espécies de *Senecio*, entre elas o *Senecio brasiliensis*.

O *Senecio brasiliensis* é uma espécie vegetal nativa, popularmente conhecida como “Flor-das-almas”, “Margaridinha” ou “Maria mole” (DE SOUZA et al., 2009). Está presente nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, além de também ocorrer no Uruguai, Paraguai, e na Argentina (KISSMANN; GROTH, 2000; LORENZI, 2008; PILATI; BARROS, 2007; SANDINI; UDO; SPINOSA, 2013).

Durante os meses de maio a agosto a espécie passa pelo seu período de brotação, florescendo entre os meses de outubro a novembro. Possui grande habilidade de dispersão e adaptação tanto em pastagens como em campos nativos, podendo ser um grande problema para a pecuária da Região Sul. O *Senecio brasiliensis* é uma planta tóxica, responsável por grande parte dos prejuízos econômicos em animais de produção, principalmente em equinos e bovinos. Apesar da baixa palatabilidade, o consumo pelos bovinos no Rio Grande do Sul ocorre em maior frequência no outono e inverno, período no qual a disponibilidade da pastagem diminui e as plantas estão em brotação (KARAM; SCHILD; DE MELLO, 2011; SANDINI; UDO; SPINOSA, 2013).

Espécies do gênero *Senecio* são conhecidas pela produção de compostos como alcalóides pirrolizidínicos (PAs) que são responsáveis pela toxicidade causada por esse gênero vegetal (ELIAS et al., 2011). Os PAs são fitotoxinas naturais encontradas em muitas plantas em todo o mundo. Os maiores teores de alcalóides são encontrados quando a planta está em período de floração, ocorrendo grande variação da quantidade de alcalóides nas diferentes partes da planta (KARAM et al., 2004).

A intoxicação por plantas do gênero *Senecio* é considerada a principal fitointoxicação em bovinos e representa importante causa de morte de bovinos na região Sul do Brasil com

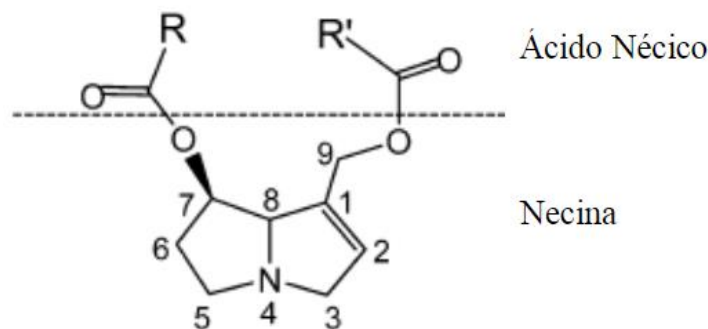
significativos prejuízos econômicos em animais de produção (BARROS et al., 2007; GRECCO et al., 2010).

## 2.2 ALCALÓIDES PIRROLIZIDÍNICOS

Os alcalóides pirrolizidínicos (PAs) são os princípios ativos tóxicos das plantas do gênero *Senecio*, porém, eles não são quimicamente reativos e grande parte deles é excretada inalterada. No entanto, podem ser metabolizados no fígado em produtos tóxicos (SANTOS et al., 2008). Os principais PAs encontrados no *Senecio brasiliensis* são a integerrimina, a senecionina e a senecifilina (TRIGO et al., 2003).

Os alcalóides pirrolizidínicos são moléculas químicas heterocíclicas compostas por um nitrogênio ligado ao anel principal e geralmente são substâncias de caráter alcalino. O núcleo básico de aminoálcool é denominado necina (núcleo pirrolizidina), sendo constituído por dois anéis de cinco átomos unidos por um único átomo de nitrogênio; a porção ácida é denominada ácido nécico e é composta por uma ou duas ramificações de éster carboxílico (Figura 1) (BOSI et al., 2013; LIU et al., 2017; PRAKASH et al., 1999).

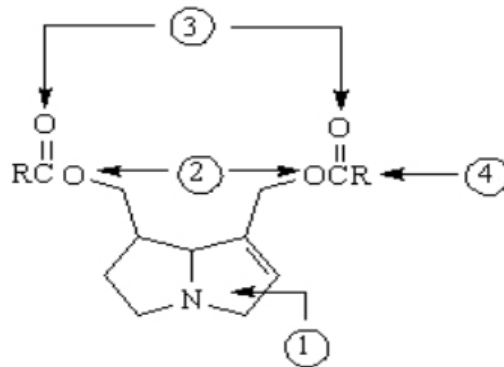
Figura 1 - Estrutura química dos alcalóides pirrolizidínicos.



Fonte: Adaptado de PRAKASH et al., 1999.

A hepatotoxicidade dos PAs é determinada por quatro características estruturais mínimas: 1) um anel 3-pirrolina; 2) um ou dois grupamentos hidroxilas ligados ao anel pirrolina; 3) um ou dois grupamentos esterificados; e 4) uma cadeia ramificada no resíduo ácido (Figura 2) (PRAKASH et al., 1999).

Figura 2 - Características estruturais mínimas para a toxicidade dos alcalóides pirrolizidínicos: 1) um anel 3-pirrolina; 2) um ou dois grupamentos hidroxilas ligados ao anel pirrolina; 3) um ou dois grupamentos esterificados; e 4) uma cadeia ramificada no resíduo ácido.



Fonte: Adaptado de PRAKASH et al., 1999.

Após a absorção, a circulação porta hepática transporta os PAs até o fígado, onde são biotransformados. Os principais processos de biotransformação dos PAs são a hidrólise, a oxidação e a desidrogenação. As duas primeiras representam mecanismos de desintoxicação, enquanto a desidrogenação, através da ação da enzima citocromo P450 (CYP450) formam os pirróis, compostos altamente reativos conhecidos como 1,2-desidropirrolizidina, o qual é o principal metabólito tóxico resultante do metabolismo dos PAs e responsável pela toxicidade das plantas do gênero *Senecio* (MCLEAN, 1970; PRAKASH et al., 1999; SANTOS et al., 2008). Após a biotransformação, os pirróis lesam as células hepáticas por inibição da mitose, causando megalocitose, necrose, morte celular e substituição por tecido fibroso (PRAKASH et al., 1999).

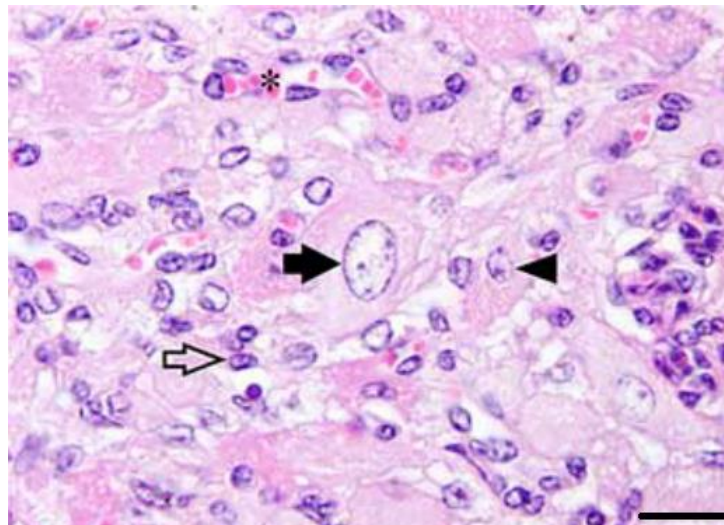
A suscetibilidade à intoxicação pelos PAs entre as espécies de animais domésticos possui variações significativas. Algumas espécies são mais resistentes à intoxicação devido à sua maior eficiência nas reações de bioativação, desintoxicação e excreção de alcalóides (HUAN et al., 1998). Os bovinos e equinos são bastante susceptíveis à intoxicação por PAs, aproximadamente 30 vezes mais susceptíveis que ovinos e caprinos. Pequenos ruminantes possuem maior resistência à intoxicação devido a sua capacidade em detoxificar os PAs no fígado, e também são animais menos seletivos quanto a ingestão de alimentos, desenvolvendo, em virtude disso, maior resistência às toxinas (HUAN et al., 1998).



### 2.2.1 Alcalóides pirrolizidínicos na reprodução animal

Por muito tempo acreditou-se que as baixas taxas reprodutivas em animais intoxicados por *Senecio* spp. eram consequência das lesões hepáticas causadas pelos PAs que, por sua vez, contribuíam com perda de peso, baixa condição corporal e queda dos índices produtivos dos animais. Porém, em 2015, Krabbe et al. sugeriu a possibilidade de se considerar que a intoxicação por *Senecio* spp. pode levar a subfertilidade por ação direta dos PAs sobre as células ovarianas. Durante seu experimento, vacas prenhes intoxicadas apresentaram ovários com megalocitose de núcleos de células luteínicas grandes (CLGs), da mesma forma que no fígado. Os bovinos intoxicados apresentaram núcleos medindo aproximadamente 24 $\mu$ m (Figura 3), enquanto os bovinos controle apresentaram núcleos com média de aproximadamente 7 $\mu$ m de diâmetro (KRABBE et al., 2015).

Figura 3 - Corpo lúteo de uma vaca prenhe que apresenta células luteínicas grandes com megalocitose (seta). Células luteínicas grande normal (cabeça de seta). Podem ser observadas células luteínicas pequenas normais (seta vazada) e capilares (\*). Corada em hematoxilina-eosina (HE). Barra = 20 $\mu$ m. Lente Obj. 40X.



Fonte: (KRABBE et al., 2015).

Sabe-se que a megalocitose está relacionada ao efeito antimitótico causado pelos PAs e não por inibição da síntese de DNA, o que induz a síntese continuada de nucleoproteínas associadas à inibição da mitose. Como as células não se dividem e continuam a sintetizar DNA, aumentam de tamanho, morrem e são substituídas por tecido fibroso (SANTOS et al., 2008).

Esses efeitos são induzidos pela ação dos pirróis no retículo endoplasmático, gerados a partir da ação enzimática do citocromo P450 (KRABBE et al., 2015). Esse grupo de enzimas é responsável por metabolizar diversos componentes, os quais muitas vezes geram agentes com maior toxicidade a partir dessa metabolização (LIU et al., 2017).

O processo de mitose é fundamental no desenvolvimento dos oócitos em vacas, bem como na formação e desenvolvimento das CLGs do corpo lúteo. Possivelmente, o fato das CLGs sofrerem mitose e apresentarem grande atividade de enzimas citocromo P450 as torna susceptíveis à ação dos pirróis e a desenvolverem megalocitose (KRABBE et al., 2015).

As CLGs são responsáveis por produzirem altas quantidades de progesterona (P4), um dos principais hormônios do desenvolvimento gestacional (BERTAN et al., 2006). A P4 desempenha funções fundamentais no sistema reprodutor das fêmeas, como a regulação e manutenção do ciclo estral, miorelaxamento uterino, e estimula a proliferação de células no endométrio, fundamentais para propiciar as condições necessárias para o desenvolvimento do embrião (BERTAN et al., 2006). Portanto, é possível que as alterações gonadais decorrentes dos PAs presentes no *Senecio* possam interferir nesses mecanismos e causar subfertilidade em vacas (BERTAN et al., 2006; OLIVEIRA; CASSAL; PIZARRO, 2003).

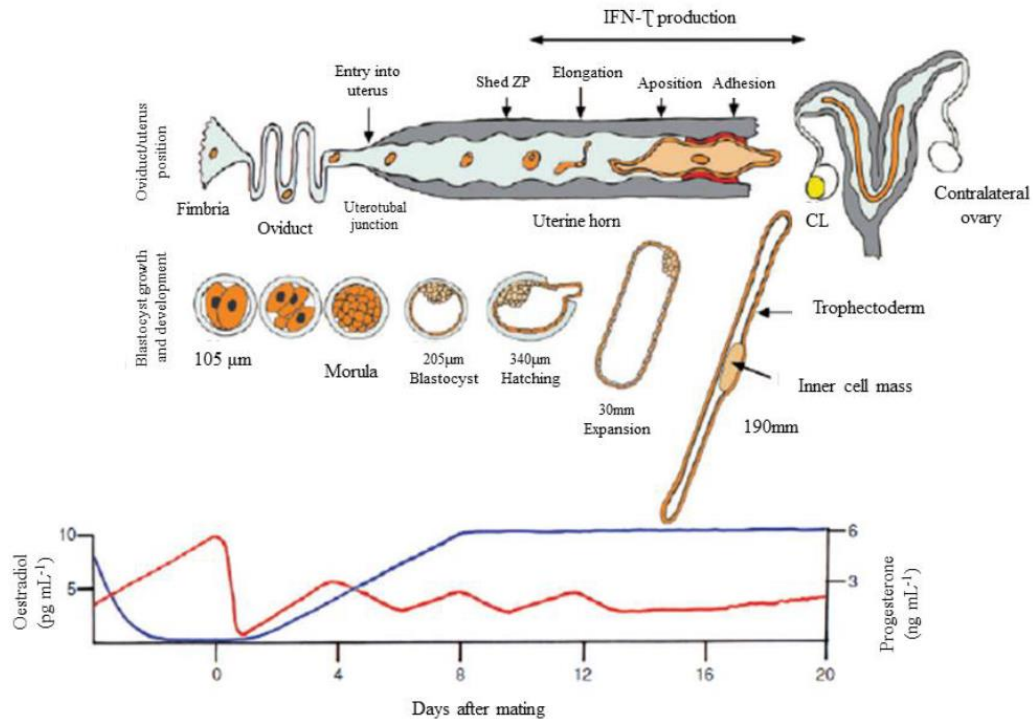
### 2.3 RECONHECIMENTO MATERNO DA GESTAÇÃO

O reconhecimento materno da gestação é o processo fisiológico pelo qual o embrião sinaliza sua presença para a mãe e prolonga a vida útil do corpo lúteo (CL) no ovário, consequentemente evitando o retorno a ciclicidade e promovendo a manutenção e o desenvolvimento embrionário (BAZER et al., 1991; NISWENDER et al., 2000).

Após a fecundação, inicia-se o processo de formação do embrião (Figura 4). As fases do processo de desenvolvimento embrionário inicial em bovinos são: fase de zigoto, quando ocorre a singamia; fase de mórula, quando o embrião entra no útero 4 a 6 dias após a fecundação do oócito; e fase de mórula compacta; após essa fase inicia-se a fase de blastocisto inicial, com a formação da blastocela e o estabelecimento de dois tipos celulares: trofoblasto e massa celular interna (embrioblasto); em seguida o blastocisto em desenvolvimento passará pela fase de expansão, até o dia 8, quando ocorre a eclosão do blastocisto da zona pelúcida (fase de blastocisto eclodido); após a eclosão o blastocisto cresce lentamente de forma tubular ou ovóide, durante a fase de alongação. A fase de alongação se inicia com 12 dias após a fertilização em ovelhas e com 15 dias em bovinos, nesta fase ocorre aumento exponencial do

comprimento e peso do trofocotoderma, formando um filamento capaz de preencher todo espaço intrauterino (Figura 4) passando a se chamar concepto (BÓ; MAPLETOFT, 2013; HIRAYAMA et al., 2014).

Figura 4 - Desenvolvimento embrionário inicial em ruminantes.



Fonte: (SPENCER et al., 2007).

O interferon tau (IFNT) é uma proteína secretada em grandes quantidades pelas células do trofoblasto do embrião de ruminantes antes da implantação. O RNAm para *IFNT* começa a ser expresso a partir do quarto dia do desenvolvimento embrionário, enquanto a proteína IFNT é detectada no sétimo dia do desenvolvimento embrionário em bovinos (KUBISCH; LARSON; ROBERTS, 1998), e tem seu pico de secreção entre os dias 14 e 16 de gestação em ovinos e entre os dias 18 e 20 em bovinos (FARIN et al., 1990), e termina durante a implantação embrionária, pois o contato do trofoblasto com o endométrio cessa a produção de IFNT (DEMMERS; DERECKA; FLINT, 2001).

O IFNT é a principal citocina secretada pelo embrião e responsável pela sinalização da gestação (ROBERTS et al., 1999; SPENCER; BAZER, 2002). Seu mecanismo de ação clássico ocorre através do controle da expressão de receptores de estrógenos (ESR1) e

consequentemente de receptores de ocitocina (OXTR) no endométrio uterino, prevenindo a produção pulsátil de prostaglandina F2 alfa (PGF), evitando a lise do corpo lúteo e retorno a ciclicidade (MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999; SPENCER; BAZER, 1996).

A progesterona (P4) é um hormônio essencial para o desenvolvimento do embrião e manutenção da gestação. Animais com elevada concentração sérica de P4 durante o reconhecimento materno da gestação tem maior crescimento embrionário e maior produção de IFNT pelas células do trofoblasto embrionário (CLEMENTE et al., 2009; RIBEIRO et al., 2016). A P4 favorece a maioria das ações do IFNT sobre o útero, e é fundamental para a receptividade uterina e implantação do embrião. O diâmetro folicular também é importante, pois vacas com maior folículo pré-ovulatório desenvolvem corpo lúteo de maior diâmetro, produzindo mais P4 e favorecendo o desenvolvimento embrionário (RIBEIRO et al., 2016).

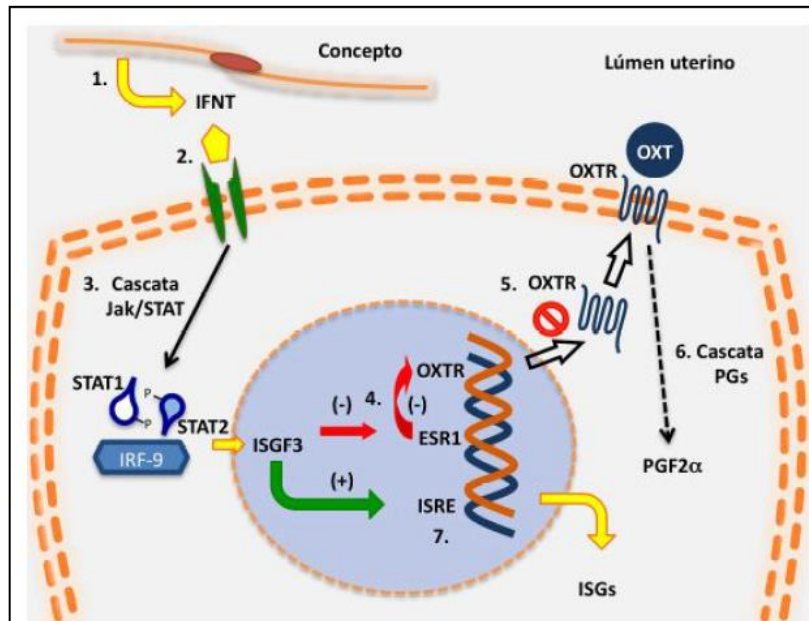
### **2.3.1 Ações do interferon tau**

O interferon tau (IFNT) é uma proteína composta por 172 aminoácidos presente somente em ruminantes. Pertence ao grupo dos interferons tipo 1 (IFN-I) e sua principal função é evitar o retorno ao estro, preservando o funcionamento do corpo lúteo durante a gestação (NISWENDER et al., 2000; ROBERTS et al., 2003). O IFNT pode atuar de maneira parácrina, endócrina e autócrina no reconhecimento materno da gestação em ruminantes.

A via de sinalização parácrina, conhecida como via clássica de sinalização do reconhecimento materno da gestação, inicia-se quando o IFNT produzido pelo concepto é secretado no lúmen uterino (Figura 5) (ROBERTS et al., 1989). O IFNT secretado pelo concepto irá se ligar aos seus receptores presentes no endométrio. Existem dois receptores de interferon tipo I que são IFNAR1 e IFNAR2, onde a molécula de IFNT se liga. Estes são expressos em todos os órgãos corporais, tendo como principal função mediar respostas antivirais. Também estão presentes no útero de ruminantes e atuam na via de sinalização parácrina (BINELLI et al., 2001). A ligação do IFNT aos seus receptores no endométrio irá ativar a cascata JAK/STAT, formando o fator de transcrição ISGF3, que irá se ligar a regiões definidas no DNA, chamadas de elementos responsivos à estimulação por interferons (ISREs), e regular a transcrição do receptor de estrógeno (ESR1) e consequentemente o receptor de ocitocina (OXTR) (Figura 5) (ANTONIAZZI et al., 2011; SPENCER; BAZER, 1996). A supressão dos receptores ESR1 e OXTR altera a cascata de síntese de prostaglandinas e

modifica o padrão de síntese e liberação de prostaglandina F2 alfa (PGF) e, conseqüentemente inibe a luteólise (ANTONIAZZI et al., 2011; MCCRACKEN; CUSTER; LAMSA, 1999).

Figura 5 - Mecanismo de ação parácrina do interferon tau durante o reconhecimento materno de gestação em bovinos.



Fonte: (ANTONIAZZI et al., 2011).

Foi demonstrado que o IFNT possui ação endócrina (Figura 6) em outros locais, como por exemplo, células imunes e luteais (HAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008). A comprovação da saída de IFNT do útero pela veia uterina sugere que a ação endócrina do IFNT possa ser um mecanismo complementar ao mecanismo intrauterino de reconhecimento materno da gestação (OLIVEIRA et al., 2008).

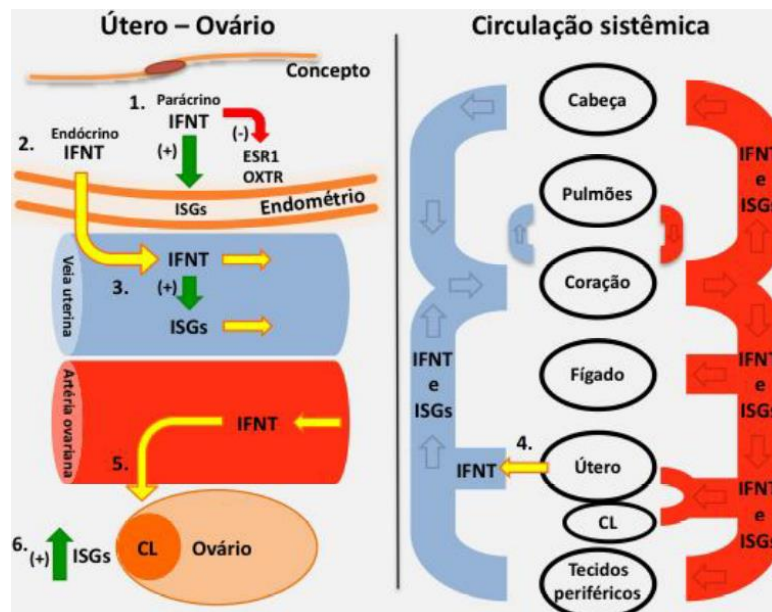
A ação do IFNT em tecidos extrauterinos eleva a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) na corrente circulatória (HAN et al., 2006), no endométrio, e no corpo lúteo durante o reconhecimento materno da gestação (OLIVEIRA et al., 2008). Aos sete dias do desenvolvimento embrionário já existe sinalização do embrião no endométrio, elevando a expressão de genes estimulados por interferon no endométrio, dentre eles *ISG15* (SPONCHIADO et al., 2017). A proteína ISG15 é detectada em quantidades significativas em lavados uterinos no dia 18 de gestação (AUSTIN et al., 1996; JOHNSON et al., 1998), e aos 19 dias de gestação em células mononucleares do sangue periférico (STEFANELLO et al., 2021).

No corpo lúteo os ISGs estão envolvidos com a resistência à ação luteolítica da PGF (ANTONIAZZI et al., 2013). Um dos estudos conduzidos para elucidar sua ação endócrina foi realizado através da infusão de IFNT recombinante ovino (roIFNT) na veia uterina de ovelhas. Os resultados demonstraram que a infusão de IFNT estende o ciclo estral além do dia 32, ou seja, o IFNT preserva a funcionalidade do corpo lúteo (BOTT et al., 2010).

A ISG15 considerada uma das principais proteínas induzidas durante a infecção viral via resposta por interferon tipo I. Além disso, a ISG15 tem sido estudada também como marcadora de gestação em bovinos e ovinos (HAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2008; STEFANELLO et al., 2021).

O mecanismo de ação autócrina do IFNT foi descoberto com a identificação da expressão de *receptores de interferon tipo I (IFNARI)* nas células do trofotoderma ovino, indicando possível função do IFNT em suas próprias células de origem (IMAKAWA et al., 2002). Para comprovar a ação do IFNT através da via autócrina foram adicionadas diferentes concentrações de IFNT recombinante bovino (rbIFNT) em cultivo celular de trofoblasto, e mostraram que o tanto o desenvolvimento celular como a expressão de *ISGs* aumentaram a medida que aumentava a concentração de rbIFNT no meio de cultivo, comprovando que o IFNT atua como regulador autócrino de proliferação das células do trofoblasto (WANG et al., 2013), sendo essencial, através das suas diferentes vias de ação (parácrina, endócrina e autócrina), para o reconhecimento materno da gestação e o desenvolvimento embrionário inicial.

Figura 6 - Mecanismo de ação parácrina e endócrina do IFNT durante o reconhecimento materno da gestação.



Fonte: (ANTONIAZZI et al., 2011).

## 2.4 ESTRESSE OXIDATIVO

A mitocôndria é o principal local de metabolismo do oxigênio, nela o oxigênio consumido pelo metabolismo celular é reduzido a água por ações enzimáticas, aproximadamente 2 a 5% do oxigênio consumido, fisiologicamente, resultará na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), os quais são subprodutos do metabolismo do oxigênio. As principais espécies reativas de oxigênio são ânions superóxidos ( $O_2^-$ ), radicais hidroxila (OH), e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (BLONDIN; COENEN; SIRARD, 1997).

As células possuem sistema de proteção antioxidante, que tem a função de inibir os efeitos deletérios de ROS (CHIHUAILAF; CONTRERAS; WITWER, 2002). Em concentrações fisiológicas as ROS são benéficas ao organismo celular, participando de diversas funções biológicas como o reinício da meiose de oócitos diplótenos (MORADO et al., 2009; SHKOLNIK et al., 2011). Porém, altas concentrações de ROS podem oxidar substratos proteicos, nucleotídicos e lipídicos, causando danos celulares e interferindo na função celular, ativando vias de inflamação e apoptose (KIZAKI et al., 2006; SLIMEN et al., 2014; SOYSAL et al., 2017; UCHIKURA et al., 2004).

O controle da produção e neutralização de ROS é mantido através do sistema de defesa antioxidante mitocondrial, cuja função principal é manter o equilíbrio oxidativo. O sistema antioxidante é constituído por dois grupos antioxidantes principais: enzimáticos e não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos possuem três enzimas importantes: superóxido dismutase (SOD), pertencente à classe de enzimas que catalisam a hidrólise do ânion superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio; catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPX), pertencentes à classe de enzimas que catalisam a redução do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio e, juntos, estabilizam a célula lesada (SOYSAL et al., 2017; TURRENS, 2003). Dentre os antioxidantes não enzimáticos estão compostos como as vitaminas A, C e E, selênio, entre outros (SLIMEN et al., 2014).

O estresse oxidativo ocorre quando há desequilíbrio entre os mecanismos oxidativos e as defesas antioxidantes celulares. Quando o desequilíbrio ocorre, são produzidas substâncias pró-oxidantes acima da capacidade antioxidante do organismo. Isso pode acontecer por excesso de substâncias pró-oxidantes e/ou pela deficiência no sistema antioxidante (BAYNES, 1991; PARTHIBAN et al., 1995; SIMÕES et al., 2013).

Números crescentes de estudos *in vitro* demonstram os efeitos das ROS na reprodução animal e humana (MORADO et al., 2009; SHKOLNIK et al., 2011). O estresse oxidativo tem implicado em disfunções graves como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, esclerose múltipla, envelhecimento e vários distúrbios mutagênicos, bem como teratogênicos (BANDYOPADHYAY et al., 2009; GUO et al., 2013). E marcadores de estresse oxidativo em bovinos, como mensuração de SOD e quantificação de ROS vem sendo empregados para a identificação do estresse oxidativo, bem como mecanismos para neutralizar seus efeitos deletérios, como a utilização de antioxidantes não enzimáticos em meios de maturação, fertilização e cultivo de embriões (ASCARI et al., 2017; LI et al., 2016; MISHRA et al., 2016; ROCHA-FRIGONI et al., 2016; TAKAHASHI et al., 2002).



### 3 CAPÍTULO 1

Artigo a ser submetido para publicação:

**PYRROLIZIDINE ALKALOIDS FROM *SENECIO* SPP. MODULATE GENE  
EXPRESSION OF INTERFERON TAU AND OXIDATIVE STRESS RELATED  
GENES IN BOVINE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO***

Jean Mussoi Weigert, Valério Marques Portela Jr.

Biology of Reproduction, 2022

1 **PYRROLIZIDINE ALKALOIDS FROM *SENECIO* SPP. MODULATE GENE**  
2 **EXPRESSION OF INTERFERON TAU AND OXIDATIVE STRESS RELATED**  
3 **GENES IN BOVINE EMBRYOS PRODUCED *IN VITRO***

4

5 Jean M. Weigert<sup>1</sup>, André Goetten<sup>2</sup>, Carolina S. Amaral<sup>1</sup>, Marcos H. Barreta<sup>2</sup>, Paulo Bayard  
6 Dias Gonçalves<sup>1,3</sup>, Gustavo Zamberlam<sup>4</sup>, Alfredo Q. Antoniazzi<sup>1</sup>, Valério M. Portela<sup>1</sup>.

7

8 <sup>1</sup>Biotechnology and Animal Reproduction Laboratory, BioRep, Federal University of Santa  
9 Maria, Santa Maria, RS, Brazil. <sup>2</sup>Laboratory of Animal Reproduction Physiology, LAFRA,  
10 Federal University of Santa Catarina, Curitibanos, SC, Brazil. <sup>3</sup>Molecular and Integrative  
11 Physiology of Reproduction Laboratory, MINT, Federal University of Pampa, Uruguaiana,  
12 RS, Brazil. <sup>4</sup>Centre de Recherche en Reproduction et Fertilité, Faculté de Médecine  
13 Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Quebec, J2S 7C6, Canada.

14

15 **Corresponding author:** Valério M. Portela, Biotechnology and Animal Reproduction  
16 Laboratory, BioRep, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil; e-mail:  
17 valerio.portela@ufsm.br

**18 Abstract**

19 Senecionine (SN) and seneciphylline (SP) are members of the pyrrolizidine alkaloid  
20 (PA), family of compounds that are found in many plant species worldwide, among them,  
21 *Senecio* spp. They are the most important toxic plants affecting cattle in southern Brazil. The  
22 PAs contained in *Senecio* spp. become toxic when they are biotransformed by the action of  
23 the cytochrome P450 enzyme. We hypothesize that PAs cause effects on ovarian cells and  
24 bovine embryos, being responsible for significant decreases in cattle reproductive  
25 performance and productivity. To clarify this matter, we aimed to investigate interferon tau  
26 (*IFNT*), oxidative stress and cell survive related genes under SN and SP influence on *in vitro*  
27 embryo production. Cumulus-oocyte complexes (COCs) were matured under PAs conditions,  
28 fertilized, and cultured without PAs conditions (IVM groups); or COCs were matured and  
29 fertilized without PAs conditions and the zygotes were cultured under PAs conditions (IVC  
30 groups). On day 7, PAs did not alter embryos that were poisoned during COCs maturation,  
31 except in *IFNT* expression (SP treatment;  $P<0.05$ ). However, PAs (especially SN) poisoning  
32 during IVC affect not only *IFNT*, but also oxidative stress and cell survival genes ( $P<0.05$ ). In  
33 conclusion, the PAs could be modulating the expression of oxidative stress and cell survival  
34 genes in embryos, impairing the expression of *IFNT* and compromising the early embryo  
35 development during in vitro bovine embryo culture.

36

37 **Keywords:** Interferon tau, oxidative stress, pyrrolizidine alkaloids, early embryo  
38 development, plant intoxication.

## 39 Introduction

40 *Senecio brasiliensis* is the most widely distributed species of *Senecio* spp. in Brazil  
41 and responsible for the great majority of cases of spontaneous intoxication in cattle. It is a  
42 native weed in South America and widely distributed in the southern region of Brazil,  
43 Uruguay, Argentina and Paraguay (KISSMANN & GROTH, 2000; Lorenzi, 2008). It is well  
44 established that *Senecio* spp. are the most important toxic plants affecting cattle in southern  
45 Brazil (Barros et al., 2007; Driemeier et al., 1991; Grecco et al., 2010; Panziera et al., 2018).  
46 More than 50% of all cattle deaths caused by toxic plants in Southern Brazil is caused by  
47 *Senecio* spp. (Barros et al., 2007; Karam et al., 2004; Riet-Correa & Medeiros, 2001; Rissi et  
48 al., 2007).

49 The toxic principle of plants of the genus *Senecio* comprises pyrrolizidine alkaloids  
50 (PAs). Senecionine (SN) and seneciphylline (SP) are members of PA family of compounds  
51 that are common constituents of many diverse plant species and toxic to a variety of  
52 mammalian tissues (Gordon et al., 2000). The PAs contained in the plants are not chemically  
53 reactive, and most of them are excreted unchanged. However, they become toxic when  
54 biotransformed in the liver by the action of the cytochrome P450 enzyme (CYP450; and its  
55 isoforms), whose expression is regulated by the *cytochrome P450 1A1* gene  
56 (*CYP1A1*)(Gordon et al., 2000; Pocar et al., 2004), into a highly reactive pyrrole, known as  
57 1,2-dehydropyrrolizidine, which is the primary toxic metabolite. Secondary toxic metabolites,  
58 termed alcoholic pyrroles, are also formed (McLean, 1970; Prakash et al., 1999). A number of  
59 PAs have been extracted from *S. brasiliensis*, including integerrimine, senecionine,  
60 seneciphylline, retrorsine, and usuramine (Trigo et al., 2003). After the biotransformation, the  
61 pyrroles are capable of producing chronic and irreversible damage, characterized by inhibition  
62 of cell mitosis, megalocytosis and cell death (Prakash et al., 1999).

63           The intoxication with *Senecio* spp. has always been described targeting the liver and  
64 hepatocytes, as they can express and transcribe the *CYP450*, responsible for converting PAs  
65 into pyrrole groups (Huan et al., 1998). However, Krabbe et al. 2015 highlights that *Senecio*  
66 *brasiliensis* intoxication causes changes in bovine ovaries, especially luteal cell  
67 megalocytosis. A likely hypothesis for the alterations in bovine ovaries is the fact that the  
68 ovaries are able to express and transcribe CYP450 and its isoforms (Leighton et al., 1995).  
69 These data lead us to believe that intoxication by *Senecio* spp. can cause subfertility due to the  
70 direct action of PAs on ovarian cells and in the early bovine embryo development. Allied to  
71 this, there are damages caused to hepatocytes, which are cumulative and irreversible, and will  
72 cause a significant decrease in cattle productive and reproductive performance.

73           Maternal recognition of pregnancy (MRP) in ruminants occurs on pre-implantation  
74 period of pregnancy when the conceptus signals to the mother its presence by interferon tau  
75 (IFNT) secretion, which act in the uterus avoiding PGF luteolytic pulses (Bazer et al.,  
76 1986)(McCracken et al., 1999; Niswender et al., 2000; Spencer & Bazer, 1996). Also, IFNT  
77 action has been identified in extrauterine tissues in an endocrine manner (Han et al., 2006;  
78 Oliveira et al., 2008) to protect the corpus luteum against PGF pulses (Antoniazzi et al., 2013;  
79 Bott et al., 2010). It led us to believe that PAs can affect and cause damage in both early  
80 bovine embryos development and ovarian cells compromising IFNT production and  
81 consequently the MRP.

82           The production of reactive oxygen species (ROS) mediates oxidative stress, and  
83 pyrrole groups can cause cell damage and oxidative stress through the production of reactive  
84 oxygen and nitrogen species (Bandyopadhyay et al., 2009). ROS participates in several  
85 biological functions. However, pathological processes may occur when an imbalance between  
86 ROS production and antioxidant capacity takes place in the cells (Slimen et al., 2014; Soysal  
87 et al., 2017). Oxidative stress is controlled by a complex antioxidant system constituted of

88 enzymatic and nonenzymatic antioxidants, including three important enzymes: superoxide  
89 dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPX) (Soysal et al., 2017).  
90 Enhanced intracellular ROS may cause DNA and mitochondrial damage (Slimen et al., 2014),  
91 leading to nonspecific modification of lipids and proteins (Wang et al., 2013), activating cell  
92 autophagy mechanisms (Kiffin et al., 2004) and apoptosis (Boveris & Chance, 1973). It has  
93 been reported that any source of stress has the potential to disrupt the process of interactions  
94 between the uterus and the embryo (Thatcher et al., 1995), consequently compromising the  
95 establishment and maintenance of pregnancy. Therefore, the oxidative stress caused by  
96 pyrrole groups may be directly related to the decrease in fertility rates and early embryonic  
97 development.

98         Therefore, we hypothesized that PAs affect early bovine embryos development as well  
99 as affect ovarian cells, thus lead to oxidative stress and compromising the production of IFNT  
100 by the bovine embryos and consequently the MRP. The objectives of the present study were:  
101 (a) to evaluate the effects of PAs during oocyte maturation, and on embryo development  
102 under *in vitro* conditions; (b) to demonstrate the effect of PAs on *IFNT* gene expression in  
103 embryos produced *in vitro*; (c) to investigate the effect of PAs on oxidative stress genes  
104 expression.

105

## 106 **Materials and methods**

### 107 ***Chemicals***

108         Chemicals and reagents were purchased from Sigma Chemical Company (Sigma-  
109 Aldrich, St. Louis, MO, USA), unless otherwise indicated.

110

### 111 ***Oocyte recovery and in vitro maturation***

112 Cow ovaries were obtained from a local slaughterhouse and transported to the  
113 laboratory in saline solution (0.9% NaCl; 30°C) containing 100 IU/ml penicillin and 50 µg/ml  
114 streptomycin sulfate. COCs from 3 to 8 mm diameter follicles were aspirated with a vacuum  
115 pump (vacuum rate of 20 ml of water/min). The COCs were recovered and selected under a  
116 stereomicroscope. Grade 1 and 2 COCs (Leibfried & First, 1979) were randomly distributed  
117 (average of 42 COCs per group) into 400 µl of maturation medium in four-well plates (Nunc,  
118 Roskilde, Denmark), with graded concentrations of PAs (SN or SP; 0, 1, 10 or 100 ng/ml;  
119 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or ethanol (control groups) added at this stage of cultivation in  
120 their respective groups and concentrations to assess the effects of PAs during oocyte  
121 development. Oocytes were cultured in an incubator at 39°C in 5% CO<sub>2</sub> and 95% air, for 24 h.  
122 The maturation medium used was TCM199 containing Earle's salts and L-glutamine (Gibco  
123 Labs, Grand Island, NY), supplemented with 25 mM HEPES, 0.2 mM pyruvic acid, 2.2  
124 mg/ml sodium bicarbonate, 100 IU/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin sulfate, 0.4%  
125 fatty acid-free BSA.

126

### 127 *In vitro fertilization*

128 After *in vitro* maturation, bovine oocytes were fertilized *in vitro* with frozen thawed  
129 semen and fractionated on discontinuous Percoll (GE Healthcare, São Paulo, SP, Brazil)  
130 gradient (Parrish et al., 1986). Sperm was diluted and added to the COCs plate with final  
131 concentration adjusted to  $2 \times 10^6$  sperm/ml in Fert-TALP medium containing 10 µg/ml  
132 heparin, 20 µg/ml penicillin, 15 mM hypotaurine, and 1 µM epinephrine (Machado et al.,  
133 2015; Parrish et al., 1988). Fertilization was carried out by coculture of sperm and oocytes for  
134 18–20 h in four-well plates in the same atmospheric conditions used for maturation. *In vitro*  
135 fertilization day was considered as day 0 of embryo production.

136

137 ***In vitro embryo culture***

138           After *in vitro* fertilization, presumptive bovine zygotes were denuded by vortexing,  
139 and then cultured in groups of 8 in a culture chamber (CBS Scientific, Del Mar, CA) at 39°C  
140 and saturated humidity atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub> for 7 days in 400  
141 µl of synthetic oviduct fluid of non-sequential medium (SOF) in four-well plates (Nunc,  
142 Roskilde, Denmark), as previously described (Holm et al., 1999), with graded concentrations  
143 of PAs (SN or SP; 0, 1, 10 or 100 ng/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) or ethanol (control  
144 groups) added at this stage of cultivation in their respective groups and concentrations to  
145 assess the effects of PAs during early embryo development. Cleavage rates were evaluated 48  
146 h after fertilization and blastocyst rates were assessed on day 7 of embryo development.  
147 Blastocysts evaluated on day 7 were rinsed three times in phosphate-buffered saline (PBS)  
148 and collected in a pool of eight embryos stored at -80°C for subsequent RNA extraction.

149

150 ***RNA extraction, reverse transcription, and real-time polymerase chain reaction***

151           The total RNA was extracted from 8 blastocysts per treatment and replicated on day 7  
152 by using the PureLink™ RNA Mini Kit (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA, USA)  
153 according to the manufacturer's recommendations. Quantification and estimation of RNA  
154 purity were performed using Nanodrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific;  
155 absorbance 260/280 nm ratio). RNA was treated with 0.1 U DNase Amplification Grade  
156 (Thermo Fisher Scientific) for 15 min at 27°C to neutralize any DNA molecules. DNase was  
157 inactivated with 1 µl ethylenediaminetetraacetic acid for 10 min at 65°C. Reverse  
158 transcription was performed adding 1 U Script cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA)  
159 for 5 min at 25°C followed by 30min at 42°C and 5 min at 85°C. qPCR was conducted in a  
160 thermocycler (Bio-Rad) using 2 µl of complementary DNA (cDNA) and 8 µl of MIX  
161 containing forward and reverse bovine specific primers (Table 1), nucleases free water, and



162 GoTaq® Master Mix (Promega Corporation, Madison). Amplification was performed with an  
163 initial denaturation at 95°C for 5 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s  
164 and annealing/extension at 60°C for 30s. To optimize the RT-qPCR assays, serial dilutions of  
165 cDNA templates were used to generate a standard curve, and efficiency between 90% and  
166 110% and coefficient of determination (R<sup>2</sup>) higher than 0.98 were considered. Samples were  
167 run in duplicate and the results of all genes were expressed relative to the *RPS18* reference  
168 gene (Pfaffl, 2001). The relative quantification of gene expression across treatments was  
169 evaluated using the ddCt method (Zhang & Ealy, 2012).

170

### 171 ***Experimental design***

#### 172 *Experiment 1 - Detection of cytochrome P450 1A1 mRNA expression in ovarian cells*

173 To determine *CYP1A1* mRNA expression in ovarian cells, follicles of diameter 6 to 10  
174 mm were dissected from the ovaries of adult cows (predominantly *Taurus*) obtained from a  
175 local slaughterhouse and transported to the laboratory in saline solution on ice (0.9% NaCl).  
176 The antral cavity was flushed repeatedly with cold saline, and granulosa cells were recovered  
177 by centrifugation at 1200 g for 1 min and pooled with the follicular fluid pellet. The  
178 remaining granulosa cells adhering to the follicle wall were removed by gently scraping with  
179 a blunt Pasteur pipette, and the theca layer was removed with forceps and washed in saline by  
180 repeated passages through a 1 ml syringe. Samples were collected in Trizol (Invitrogen Life  
181 Technologies), homogenized with a Polytron, and submitted immediately to total RNA  
182 extraction according to the manufacturer's protocol.

183

#### 184 *Experiment 2 - Effect of PAs on cumulus-oocyte complexes in vitro maturation*

185 The present experiment was designed to evaluate the effect of two major PAs presents  
186 in *S. brasiliensis* (SN and SP) in graded concentrations (0, 1, 10 or 100 ng/ml) on cumulus-

187 oocyte complexes (COCs) during *in vitro* maturation. COCs were randomly distributed into  
188 the following groups: (a) control group, ( $n = 42$ ); (b) COCs matured under SN conditions  
189 (IVM SN;  $n = 42$ ); (c) COCs matured under SP conditions (IVM SP;  $n = 42$ ). All groups were  
190 treated with 0, 1, 10 or 100 ng/ml of the respective PA or ethanol (control groups), and 100  
191 ng/ml FSH on IVM. After IVM, matured COCs were fertilized and cultured without any  
192 addition of PAs until day 7. The study was completed in five replicates. Cleavage and  
193 blastocyst rates were evaluated, respectively, 2 and 7 days after fertilization in an *in vitro*  
194 production performed as described above.

195

### 196 *Experiment 3 - Effect of PAs on in vitro embryo culture*

197 In experiment 3 was evaluate the effect of the same PAs utilized previously (SN and  
198 SP) in graded concentrations (0, 1, 10 or 100 ng/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) on *in*  
199 *vitro* embryo culture. Firstly, COCs were matured without any addiction of PAs. Matured  
200 COCs were randomly distributed into the following groups: (a) control group ( $n = 42$ ); (b)  
201 COCs cultured until day seventh under SN conditions (IVC SN;  $n = 42$ ); (c) COCs cultured  
202 until day seventh under SP conditions (IVC SP;  $n = 42$ ); All groups were treated with 100  
203 ng/ml FSH on IVM; and 0, 1, 10 or 100 ng/ml of the respective PA or ethanol (control  
204 groups) on *in vitro* culture. The study was completed in five replicates. Cleavage and  
205 blastocyst rates were evaluated, respectively, 2 and 7 days after fertilization in an IVC  
206 procedure performed as described above.

207

### 208 *Statistical analysis*

209 Proportion of blastocysts were arcsine transformed before the analysis. The analysis of  
210 variance was performed with software JMP (SAS Institute) with the treatment as main effect  
211 and replicates as a random variable. Differences between the means were tested with the

212 Tukey multiple comparison test. The homogeneity of variance was tested with O'Brien test.  
213 Data that did not follow a normal distribution (Shapiro-Wilk test) were transformed into  
214 logarithms. Differences were considered at  $P < 0.05$ .

215

## 216 **RESULTS**

### 217 ***Cytochrome P450 1A1 mRNA abundance in ovarian cells.***

218 Real-time PCR revealed the presence of CYP1A1 mRNA predominantly in granulosa  
219 cells, in theca cells and in bovine embryo (Figure 1).

220

### 221 ***The effect of PAs on cleavage and blastocyst rates of bovine embryos produced in vitro.***

222 Senecionine (SN; Figure 2a) and seneciphylline (SP; Figure 2c) did not affect cleavage  
223 rate ( $P > 0.05$ ) on IVM either IVC groups (Figure 3a and 3c, respectively) when compared to  
224 the IVM and IVC control groups respectively.

225 On day 7 after IVF, all maturation treated (IVM) groups (SN: Figure 2b; SP: Figure  
226 2d) had no differences in the blastocysts developmental rates ( $P > 0.05$ ), when compared to the  
227 control groups. Groups treated with PAs (SN: Figure 3b; SP: Figure 3c) during *in vitro*  
228 embryo culture (IVC groups) had difference in the blastocysts developmental rates ( $P < 0.05$ ),  
229 when compared to the IVC control groups. The 1 ng/ml and 10 ng/ml IVC SN groups (Figure  
230 3b) were no difference ( $P > 0.05$ ) when compared to the IVC SN control groups. However, the  
231 100 ng/ml IVC SN groups (Figure 3b) presented decreased blastocysts developmental rates  
232 ( $P < 0.05$ ) when compared to the IVC SN control groups. The 1 ng/ml IVC SP groups were no  
233 difference ( $P > 0.05$ ) when compared to the IVC SP control groups, however, the 10 ng/ml and  
234 100 ng/ml IVC SP groups presented decreased developmental rates ( $P < 0.05$ ) when compared  
235 to the IVC SP control groups (Figure 3d).

236

237 ***IFNT mRNA abundance in bovine embryos exposed to PAs***

238 On day 7, *IFNT* mRNA abundance was determined by real-time quantitative  
239 polymerase chain reaction (RT-qPCR). The image of *IFNT* mRNA expression (Figure 4)  
240 showed that *IFNT* decrease ( $P<0.05$ ) when the embryos of IVC groups were exposed to SN  
241 concentrations (Figure 4c), but when the embryos were exposed to SP concentrations there  
242 were no difference ( $P>0.05$ ), when compared to the control groups (Figure 4d). In the groups  
243 treated with PAs on *in vitro* maturation. There was a difference ( $P<0.05$ ) in the groups treated  
244 with SP (Figure 4b), of which only 1 ng/ml IVM SP group did not present difference when  
245 compared to the IVM SP control group, whereas 10 ng/ml and 100 ng/ml IVM SP groups  
246 presented difference ( $P<0.05$ ) when compared to the IVM SP control group (Figure 4b). The  
247 groups treated with SN during *in vitro* maturation did not have difference ( $P>0.05$ ) in *IFNT*  
248 mRNA expression when compared to the IVM SN control group (Figure 4a).

249

250 ***Oxidative stress profile and cellular defense of bovine embryos exposed to PAs***

251 Figures 6 and 7 show the mRNA relative expression of *CAT* (Figure 6a), *GPX1*  
252 (Figure 6b), *SOD1* (Figure 6c), *SOD2* (Figure 6d), and *HSP90* (Figure 7c) of the groups  
253 treated with SN during *in vitro* embryo culture (IVC SN). *CAT* mRNA expression had  
254 difference when compared to the control group. *GPX1*, *SOD1*, *SOD2* and *HSP90* mRNA  
255 levels were downregulated ( $P<0.05$ ) when compared to their respective IVC SN control  
256 groups.

257 There was no difference in the groups treated with SP during *in vitro* culture: *CAT*  
258 (Figure 6e), *GPX1* (Figure 6f), *SOD1* (Figure 6g), *SOD2* (Figure 6h); and *HSP90* (Figure 7d),  
259 of which only *GPX1* (Figure 6f) showed difference ( $P<0.05$ ) in 100 ng/ml IVC SP group  
260 when compared to their respective IVC SP control groups.

261           There was no difference in the groups treated with SN (IVM SN groups: *CAT*, *GPXI*,  
262 *SOD1* and *SOD2*; Figure 5a-5d) or SP (IVM SP groups: *CAT*, *GPXI*, *SOD1* and *SOD2*;  
263 Figure 5e-5h) in maturation, as there was no difference in mRNA expression for *HSP90*  
264 (Figure 7a-7b), when compared to their respective control groups.

265

## 266 **Discussion**

267           This study provides an overview of influence of the main PAs (SN and SP) present in  
268 *Senecio brasiliensis* on *in vitro* embryo production. Another study from our group identified,  
269 through the analysis of epidemiological factors, such as the presence of the plant, associated  
270 with the activity of the enzyme gamma glutamyl transferase (GGT) and liver damage the  
271 effects caused by poisoning by *Senecio* spp. on reproduction. Cows with higher GGT had  
272 lower pregnancy rate, smaller CL diameter, lower concentration of progesterone, and lower  
273 *ISG15* mRNA relative expression (Stefanello et al., 2021), which means that cows with a  
274 higher degree of poisoning by *Senecio* spp. had worst reproductive indices. Therefore, we  
275 evaluated the effects of PAs on COCs maturation and early embryo development *in vitro*. Our  
276 mainly finding were: 1) *CYP11A1* mRNA is expressed on granulosa cells, theca cells, and  
277 bovine embryos; 2) PAs treatment during IVM did not alter cleavage and embryo  
278 development rates, oxidative stress parameters and cell survival; 3) Although COCs treated  
279 with SP during IVM developed to the blastocyst stage, there is a lower expression of *IFNT* in  
280 a dose-dependent manner; 4) Zygotes treated both with SN and SP during IVC had lower  
281 blastocyst rates in a dose-dependent manner; and 5) Zygotes treated with 100ng/ml SN during  
282 IVC had lower expression of *IFNT*, antioxidant enzymes and cell survival genes, but SP  
283 treatment was no difference among groups.

284

285           The PAs become toxic when they are biotransformed by the action of the CYP450  
286 (and its isoforms) into a highly reactive pyrrole (McLean, 1970; Prakash et al., 1999). After  
287 the biotransformation, the pyrroles can produce chronic and irreversible damage,  
288 characterized by inhibition of cell mitosis, causing megalocytosis and cell death (Prakash et  
289 al., 1999). A recent study report that PAs also acts directly on ovarian cells, causing  
290 megalocytosis in large luteal cells (LLC) in cows poisoning by *Senecio* spp. (Krabbe et al.,  
291 2015). So, we research CYP450 expression on follicular and embryonic cells, and our data  
292 show that both ovaries (granulosa and theca cells) and bovine embryos (day 7) expressed  
293 CYP450 mRNA (Figure 1), indicating that the presence of this enzyme may be involved in  
294 the biotransformation of pyrroles in these tissues.

295           In this study, we used an *in vitro* bovine embryo production model to be poisoning the  
296 oocyte maturation (IVM) and early embryo development until day 7 (IVC). Interestingly, the  
297 groups treated on IVM both with SP and SN had no difference among groups in cleavage and  
298 blastocyst rates. However, the cumulative effect among days of IVC decreased the blastocyst  
299 rates of both SN and SP treated groups in a dose-dependent response. It means the embryo  
300 can repair damage occurred on oocyte maturation during its embryonic development (Ménézo  
301 et al., 2010) or PAs poisoning during IVM is not sufficient to cause a decrease in embryo  
302 development rates. Therefore, to try to elucidate this, we accessed abundance of *IFNT*;  
303 antioxidant enzymes *SOD1*, *SOD2*, *GPX* and *CAT*; and cell survival gene *HSP90* among  
304 groups.

305           IFNT is a cytokine produced by trophectoderm and it is essential for the MRP in cattle  
306 (Spencer et al., 2004) and consequently for embryo development (Brooks et al., 2014). *IFNT*  
307 mRNA begins to be expressed at day 4 in *in vitro* produced embryos (Talukder et al., 2017)  
308 and can be considered a good marker for embryonic health (Roberts et al., 2008). In our  
309 study, although we had no difference between embryo development rates, the IVM SP group

310 (10 and 100 ng/ml treatments) had a lower abundance of *IFNT* mRNA. However, comparing  
311 IVC groups, SN-treated group decreased expression of *IFNT* mRNA in all treatment doses (1,  
312 10 and 100 ng/ml). According demonstrated by Krabbe (2015), PAs impairs LLCs causing  
313 megalocytosis in cows poisoning by *Senecio* spp. It is known LLCs produce progesterone  
314 (P4), a key hormone responsible for embryo development during pre-implantation phase and  
315 its low concentration in early pregnancy period has been correlated to negative effects on  
316 embryo development and elongation (Carvalho et al., 2017; Garcia-Ispuerto & López-Gatius,  
317 2017). Another data from our group (dos Santos Amaral et al., 2021) showed the correlation  
318 between lower P4 production by corpus luteum and impairment in endocrine MRP signaling.  
319 Thus, possibly this decrease in expression of *IFNT* mRNA may be related to the action of PAs  
320 on ovarian and embryonic cells.

321 ROS production and antioxidant capacity must be a well-balanced condition in  
322 physiological situations (Turrens, 2003). However, in some adverse conditions (dos Santos  
323 Amaral et al., 2021), like pyrroles intoxication, cellular mechanisms experience an imbalance  
324 in oxidative metabolism and the production of ROS increases (Guérin et al., 2001). In our  
325 experiments, we observed no difference in IVM SP and IVM SN among treatment groups; but  
326 in IVC SN groups, there is a decrease in mRNA levels on all antioxidant enzymes analyzed,  
327 especially in 100 ng/ml SN treated group, when compared to the control groups. *GPXI*  
328 mRNA was upregulated in SP groups when compared to the control groups. SOD belongs to  
329 the enzymes class that catalyze superoxide anion hydrolysis into oxygen and hydrogen  
330 peroxide; CAT and GPX catalyze hydrogen peroxide reduction in water, and together  
331 stabilizes the injured cell (Slimen et al., 2014; Turrens, 2003). The function of these  
332 antioxidant enzymes is to prevent the accumulation of ROS in cells, by reducing ROS to O<sub>2</sub>  
333 and H<sub>2</sub>O, to avoid oxidative stress. Thus, our data showed the depletion of antioxidant  
334 enzymes system on IVC SN group, principally at the highest SN treatment dose (100 ng/ml),

335 probably caused by the occurrence of oxidative stress. The isolated action of GPX in the IVC  
336 SP group is not indicative of improvement in the enzymatic antioxidant system, as it is  
337 primarily dependent on the action of SOD, which remains unchanged in this group.

338

339         The low expression of mRNA for antioxidant enzymes may lead to oxidative stress,  
340 which is involved in many pathological processes, like DNA damage and apoptosis (Slimen et  
341 al., 2014; Wang et al., 2013). For this reason, we investigated if the cell survival gene *HSP90*  
342 are modulated by PAs on embryos. HSPs belong to the protein class named chaperones and  
343 are induced as a defense mechanism in any type of cellular stress (Lindquist & Craig, 1988).  
344 Larvae of *Drosophila melanogaster* experimentally poisoning by *Senecio brasiliensis* had a  
345 significant decrease of cell viability (Macedo et al., 2017). However, IVM groups had no  
346 difference in cell survival gene accessed. On the other hand, IVC SN group had a decrease of  
347 *HSP90* in highest treated concentration. These results suggest that when embryo is poisoning  
348 by 100 ng/ml of SN it loses the ability to protect itself by cell survival mechanisms, possibly  
349 causing cell damage.

350

351         In summary, this study supports our hypothesis that PAs affect early bovine embryos  
352 development. But curiously, PAs did not alter embryos that were poisoned during COCs  
353 maturation, except in *IFNT* expression (SP treatment). In general, COCs that are poisoned  
354 during IVM are able to reverse damage in antioxidant enzymes and cell survival gene  
355 transcription during their zygotic/embryonic development. However, their lower *IFNT*  
356 abundance could induce poor embryo quality and development, leading to implantation  
357 failure and subfertility. PAs (especially SN) poisoning during IVC affect not only *IFNT*, but  
358 also antioxidant enzymes and cell survival genes. Further studies should be carried out to  
359 elucidate our findings. In conclusion, we can affirmative until now that poisoning by *Senecio*



360 spp. could be modulating the expression of oxidative stress and cell survival genes in  
361 embryos, impairing the expression of *IFNT*, suggesting decreases in pregnancy rates of  
362 bovine.

363

#### 364 **Conflict of interests**

365 The authors declare that there is no conflict of interests.

366

#### 367 **Funding**

368 This study was supported by CAPES Brazil, FAPERGS, and the National Council for  
369 Scientific and Technological Development (CNPq), and financially supported by CAPES.

370

#### 371 **Acknowledgments**

372 The authors would like to thank Frigorífico El'Golli for providing the bovine ovaries.

373

#### 374 **References**

375 Antoniazzi, A. Q., Webb, B. T., Romero, J. J., Ashley, R. L., Smirnova, N. P., Henkes, L. E.,

376 Bott, R. C., Oliveira, J. F., Niswender, G. D., Bazer, F. W., & Hansen, T. R. (2013).

377 Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F2

378 alpha-induced luteolysis in ewes. *Biology of Reproduction*, 88(6), 144.

379 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.105684>

380 Bandyopadhyay, S., Ganguly, S., Mandal, G., Sen, R., Saha, P., Ghosh, M. K., Sarkar, M., &

381 Chatterjee, M. (2009). Cytotoxicity of Senecio in macrophages is mediated via its

382 induction of oxidative stress. *Research in Veterinary Science*, 87(1), 85–90.

383 <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.12.007>

384 Barros, C. S. L., Castilhos, L. M. L., Rissi, D. R., Kommers, G. D., & Rech, R. R. (2007).

- 385 Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em  
386 bovinos. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 27(1), 53–60. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2007000100010)  
387 736X2007000100010
- 388 Bazer, F. W., Vallet, J. L., Roberts, R. M., Sharp, D. C., & Thatcher, W. W. (1986). Role of  
389 conceptus secretory products in establishment of pregnancy. *Journal of Reproduction*  
390 *and Fertility*, 76(2), 841–850. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0760841>
- 391 Bott, R. C., Ashley, R. L., Henkes, L. E., Antoniazzi, A. Q., Bruemmer, J. E., Niswender, G.  
392 D., Bazer, F. W., Spencer, T. E., Smirnova, N. P., Anthony, R. V., & Hansen, T. R.  
393 (2010). Uterine vein infusion of Interferon Tau (IFNT) extends luteal life span in ewes.  
394 *Biology of Reproduction*, 82(4), 725–735. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.079467>
- 395 Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.  
396 General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134(3), 707–  
397 716. <https://doi.org/10.1042/bj1340707>
- 398 Brooks, K., Burns, G., & Spencer, T. E. (2014). Conceptus elongation in ruminants: Roles of  
399 progesterone, prostaglandin, interferon tau and cortisol. In *Journal of Animal Science*  
400 *and Biotechnology* (Vol. 5, Issue 1). J Anim Sci Biotechnol.  
401 <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-53>
- 402 Carvalho, P. D., Consentini, C. C., Weaver, S. R., Barleta, R. V., Hernandez, L. L., & Fricke,  
403 P. M. (2017). Temporarily decreasing progesterone after timed artificial insemination  
404 decreased expression of interferon-tau stimulated gene 15 (ISG15) in blood leukocytes,  
405 serum pregnancy-specific protein B concentrations, and embryo size in lactating Holstein  
406 cows. *Journal of Dairy Science*, 100(4), 3233–3242. [https://doi.org/10.3168/jds.2016-](https://doi.org/10.3168/jds.2016-11996)  
407 11996
- 408 dos Santos Amaral, C., Correa, G. R. E., Mujica, L. K. S., Fiorenza, M. F., Rosa, S. G.,

- 409 Nogueira, C. W., Portela, V. M., Comim, F. V., Schoenau, W., Smirnova, N. P., &  
410 Antoniazzi, A. Q. (2021). Heat stress modulates polymorphonuclear cell response in  
411 early pregnancy cows: I. Interferon pathway and oxidative stress. *PLoS ONE*, *16*(9  
412 September), e0257418. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0257418>
- 413 Driemeier, D., Barros, C. S. L. de, & Pilati, C. (1991). Seneciose em bovinos. *Hora Vet*, 23–  
414 30.
- 415 Garcia-Ispuerto, I., & López-Gatius, F. (2017). Progesterone supplementation in the early  
416 luteal phase after artificial insemination improves conception rates in high-producing  
417 dairy cows. *Theriogenology*, *90*, 20–24.  
418 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.006>
- 419 Gordon, G. J., Coleman, W. B., & Grisham, J. W. (2000). Induction of cytochrome P450  
420 enzymes in the livers of rats treated with the pyrrolizidine alkaloid retrorsine.  
421 *Experimental and Molecular Pathology*, *69*(1), 17–26.  
422 <https://doi.org/10.1006/exmp.2000.2308>
- 423 Grecco, F. B., Schild, A. L., Soares, M. P., Marcolongo-Pereira, C., Estima-Silva, P., &  
424 Sallis, E. S. V. (2010). Aspectos epidemiológicos e padrões de lesões hepáticas em 35  
425 surtos de intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no sul do Rio Grande do Sul.  
426 *Pesquisa Veterinária Brasileira*, *30*(5), 389–397. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000500003)  
427 [736X2010000500003](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2010000500003)
- 428 Guérin, P., El Mouatassim, S., & Ménézo, Y. (2001). Oxidative stress and protection against  
429 reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. In *Human*  
430 *Reproduction Update* (Vol. 7, Issue 2, pp. 175–189). Hum Reprod Update.  
431 <https://doi.org/10.1093/humupd/7.2.175>
- 432 Han, H., Austin, K. J., Rempel, L. A., & Hansen, T. R. (2006). Low blood ISG15 mRNA and

- 433 progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. *Journal of*  
434 *Endocrinology*, 191(2), 505–512. <https://doi.org/10.1677/joe.1.07015>
- 435 Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., & Callesen, H. (1999). High bovine  
436 blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium  
437 supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins.  
438 *Theriogenology*, 52(4), 683–700. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00162-4](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00162-4)
- 439 Huan, J. Y., Miranda, C. L., Buhler, D. R., & Cheeke, P. R. (1998). Species differences in the  
440 hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. *Toxicology*  
441 *Letters*, 99(2), 127–137. [https://doi.org/10.1016/S0378-4274\(98\)00152-0](https://doi.org/10.1016/S0378-4274(98)00152-0)
- 442 Karam, F. S. C., Soares, M. P., Haraguchi, M., Riet-Correa, F., Méndez, M. del C., &  
443 Jarenkow, J. A. (2004). Epidemiological aspects of seneciosis in southern Rio Grande do  
444 Sul, Brazil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 24(4), 191–198.  
445 <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2004000400004>
- 446 Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., & Cuervo, A. M. (2004). Activation of chaperone-  
447 mediated autophagy during oxidative stress. *Molecular Biology of the Cell*, 15(11),  
448 4829–4840. <https://doi.org/10.1091/mbc.E04-06-0477>
- 449 KISSMANN, K. G., & GROTH, D. (2000). *Plantas infestantes e nocivas* (2nd ed.). BASF.
- 450 Krabbe, A. A., Gonçalves, M. A., Pozzobon, R., Pessoa, C. R. M., Soares, M. P., Costa, R.  
451 A., & Anjos, B. L. (2015). Megalocitose de células luteínicas grandes de vacas prenhes  
452 com seneciose crônica. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 35(1), 33–38.  
453 <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2015000100008>
- 454 Leibfried, L., & First, N. L. (1979). Characterization of bovine follicular oocytes and their  
455 ability to mature in vitro. *Journal of Animal Science*, 48(1), 76–86.

- 456 <https://doi.org/10.2527/jas1979.48176x>
- 457 Leighton, J. K., Canning, S., Guthrie, H. D., & Hammond, J. M. (1995). Expression of  
458 cytochrome P450 1A1, an estrogen hydroxylase, in ovarian granulosa cells is  
459 developmentally regulated. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*,  
460 52(4), 351–356. [https://doi.org/10.1016/0960-0760\(94\)00185-O](https://doi.org/10.1016/0960-0760(94)00185-O)
- 461 Lindquist, S., & Craig, E. A. (1988). The heat-shock proteins. In *Annual Review of Genetics*  
462 (Vol. 22, pp. 631–677). Annu Rev Genet.  
463 <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.22.120188.003215>
- 464 Lorenzi, H. (2008). *Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas*  
465 (4th ed.). Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- 466 Macedo, G. E., Gomes, K. K., Rodrigues, N. R., Martins, I. K., Wallau, G. da L., Carvalho,  
467 N. R. de, Cruz, L. C. da, Costa Silva, D. G. da, Boligon, A. A., Franco, J. L., & Posser,  
468 T. (2017). Senecio brasiliensis impairs eclosion rate and induces apoptotic cell death in  
469 larvae of *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology*.  
470 *Toxicology & Pharmacology : CBP*, 198, 45–57.  
471 <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2017.05.004>
- 472 Machado, M. F., Caixeta, E. S., Sudiman, J., Gilchrist, R. B., Thompson, J. G., Lima, P. F.,  
473 Price, C. A., & Buratini, J. (2015). Fibroblast growth factor 17 and bone morphogenetic  
474 protein 15 enhance cumulus expansion and improve quality of in vitro-produced  
475 embryos in cattle. *Theriogenology*, 84(3), 390–398.  
476 <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2015.03.031>
- 477 Mccracken, J. A., Custer, E. E., & Lamsa, J. C. (1999). Luteolysis: A neuroendocrine-  
478 mediated event. *Physiological Reviews*, 79(2), 263–323.  
479 <https://doi.org/10.1152/physrev.1999.79.2.263>

- 480 McLean, E. K. (1970). The toxic actions of pyrrolizidine (senecio) alkaloids. In  
481 *Pharmacological Reviews* (Vol. 22, Issue 4, pp. 429–483).
- 482 Ménézo, Y., Dale, B., & Cohen, M. (2010). DNA damage and repair in human oocytes and  
483 embryos: A review. *Zygote*, 18(4), 357–365.  
484 <https://doi.org/10.1017/S0967199410000286>
- 485 Niswender, G. D., Juengel, J. L., Silva, P. J., Rollyson, M. K., & McIntush, E. W. (2000).  
486 Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. *Physiological*  
487 *Reviews*, 80(1), 1–29. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.1.1>
- 488 Oliveira, J. F., Henkes, L. E., Ashley, R. L., Purcell, S. H., Smirnova, N. P., Veeramachaneni,  
489 D. N. R., Anthony, R. V., & Hansen, T. R. (2008). Expression of interferon (IFN)-  
490 stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the  
491 consequence of endocrine IFN- $\tau$  release from the uterine vein. *Endocrinology*, 149(3),  
492 1252–1259. <https://doi.org/10.1210/en.2007-0863>
- 493 Panziera, W., Pavarini, S. P., Sonne, L., Barros, C. S. L., & Driemeier, D. (2018). Poisoning  
494 of cattle by Senecio spp. In Brazil: A review. In *Pesquisa Veterinaria Brasileira* (Vol.  
495 38, Issue 8, pp. 1459–1470). <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5795>
- 496 Parrish, J. J., Susko-Parrish, J. L., Leibfried-Rutledge, M. L., Critser, E. S., Eyestone, W. H.,  
497 & First, N. L. (1986). Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen.  
498 *Theriogenology*, 25(4), 591–600. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90143-3](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90143-3)
- 499 Parrish, J. J., Susko-Parrish, J., Winer, M. A., & First, N. L. (1988). Capacitation of bovine  
500 sperm by heparin. *Biology of Reproduction*, 38(5), 1171–1180.  
501 <https://doi.org/10.1095/biolreprod38.5.1171>
- 502 Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-

- 503 PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9). <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- 504 Pocar, P., Augustin, R., & Fischer, B. (2004). Constitutive Expression of CYP1A1 in Bovine  
505 Cumulus Oocyte-Complexes in Vitro: Mechanisms and Biological Implications.  
506 *Endocrinology*, 145(4), 1594–1601. <https://doi.org/10.1210/EN.2003-1254>
- 507 Prakash, A. S., Pereira, T. N., Reilly, P. E. B., & Seawright, A. A. (1999). Pyrrolizidine  
508 alkaloids in human diet. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental*  
509 *Mutagenesis*, 443(1–2), 53–67. [https://doi.org/10.1016/S1383-5742\(99\)00010-1](https://doi.org/10.1016/S1383-5742(99)00010-1)
- 510 Riet-Correa, F., & Medeiros, R. M. T. (2001). Intoxicações por plantas em ruminantes no  
511 Brasil e no Uruguai: Importância econômica, controle e riscos para a saúde pública.  
512 *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 21(1), 38–42. [https://doi.org/10.1590/S0100-](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2001000100008)  
513 [736X2001000100008](https://doi.org/10.1590/S0100-736X2001000100008)
- 514 Rissi, D. R., Rech, R. R., Pierezan, F., Gabriel, A. L., Trost, M. E., Brum, J. S., Kommers, G.  
515 D., & Barros, C. S. L. (2007). Plant and plant-associated mycotoxins poisoning in cattle  
516 in Rio Grande do Sul, Brazil: 461 Cases. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 27(7), 261–  
517 268. <https://doi.org/10.1590/s0100-736x2007000700002>
- 518 Roberts, R. M., Chen, Y., Ezashi, T., & Walker, A. M. (2008). Interferons and the maternal-  
519 conceptus dialog in mammals. In *Seminars in Cell and Developmental Biology* (Vol. 19,  
520 Issue 2, pp. 170–177). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2007.10.007>
- 521 Slimen, I. B., Najar, T., Ghram, A., Dabbabi, H., Ben Mrad, M., & Abdrabbah, M. (2014).  
522 Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A  
523 review. *International Journal of Hyperthermia*, 30(7), 513–523.  
524 <https://doi.org/10.3109/02656736.2014.971446>
- 525 Soysal, P., Isik, A. T., Carvalho, A. F., Fernandes, B. S., Solmi, M., Schofield, P., Veronese,

- 526 N., & Stubbs, B. (2017). Oxidative stress and frailty: A systematic review and synthesis  
527 of the best evidence. *Maturitas*, *99*, 66–72.  
528 <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2017.01.006>
- 529 Spencer, T. E., & Bazer, F. W. (1996). Ovine interferon tau suppresses transcription of the  
530 estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. *Endocrinology*,  
531 *137*(3), 1144–1147. <https://doi.org/10.1210/endo.137.3.8603586>
- 532 Spencer, T. E., Johnson, G. A., Bazer, F. W., & Burghardt, R. C. (2004). Implantation  
533 mechanisms: Insights from the sheep. In *Reproduction* (Vol. 128, Issue 6, pp. 657–668).  
534 Society for Reproduction and Fertility. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00398>
- 535 Stefanello, S., Amaral, C. S., Zappe, I. G., Mujica, L. K. S., Emanuelli, M. P., Portela, V. M.,  
536 Ramos, A. T., & Antoniazzi, A. Q. (2021). Evaluation of interferon-stimulated gene 15  
537 (ISG15) expression in blood neutrophils in beef cattle poisoned by *Senecio* spp.1.  
538 *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, *41*. <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-6880>
- 539 Talukder, A. K., Yousef, M. S., Rashid, M. B., Awai, K., Acosta, T. J., Shimizu, T., Okuda,  
540 K., Shimada, M., Imakawa, K., & Miyamoto, A. (2017). Bovine embryo induces an anti-  
541 inflammatory response in uterine epithelial cells and immune cells in vitro: Possible  
542 involvement of interferon tau as an intermediary. *Journal of Reproduction and*  
543 *Development*, *63*(4), 425–434. <https://doi.org/10.1262/jrd.2017-056>
- 544 Thatcher, W. W., Meyer, M. D., & Danet-Desnoyers, G. (1995). Maternal recognition of  
545 pregnancy. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, *49*, 15–28.  
546 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7623310/>
- 547 Trigo, J. R., Leal, I. R., Matzenbacher, N. I., & Lewinsohn, T. M. (2003). Chemotaxonomic  
548 value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil *Senecio* (*Senecioneae*: *Asteraceae*).  
549 *Biochemical Systematics and Ecology*, *31*(9), 1011–1022.



550 1978(03)00038-3

551 Turrens, J. F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *Journal of*  
552 *Physiology*, 552(2), 335–344. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.049478>

553 Wang, Z., Cai, F., Chen, X., Luo, M., Hu, L., & Lu, Y. (2013). The Role of Mitochondria-  
554 Derived Reactive Oxygen Species in Hyperthermia-Induced Platelet Apoptosis. *PLoS*  
555 *ONE*, 8(9), e75044. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075044>

556 Zhang, K., & Ealy, A. D. (2012). Disruption of fibroblast growth factor receptor signaling in  
557 bovine cumulus-oocyte complexes during in vitro maturation reduces subsequent  
558 embryonic development. *Domestic Animal Endocrinology*, 42(4), 230–238.  
559 <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2011.12.006>

560

561 **Figure legends**

562 **Figure 1:** Relative mRNA expression of cytochrome P450 (CYP1A1) in granulosa cells  
563 (GC), theca cells (TC) and bovine embryos (EB). Bars represent the group mean  $\pm$  SEM.

564

565 **Figure 2:** Percentage of cleavage rates of bovine embryos produced *in vitro* (day 2) under SN  
566 (a) and SP conditions (c) during oocyte maturation; and percentage of blastocyst rates of  
567 bovine embryos produced *in vitro* under SN (b) and SP conditions (d) during oocyte  
568 maturation (IVM groups), evaluated 7 days after *in vitro* fertilization.

569

570 **Figure 3:** Percentage of cleavage rates of bovine embryos produced *in vitro* (day 2) under SN  
571 (a) and SP conditions (c) during oocyte fertilization and embryo culture; and percentage of  
572 blastocyst rates of bovine embryos produced *in vitro* under SN (b) and SP conditions (d)  
573 during oocyte fertilization and embryo culture (IVC groups), evaluated 7 days after *in vitro*  
574 fertilization. Different letters indicate statistical significance among groups ( $P < 0.05$ ).

575

576 **Figure 4:** Relative mRNA expression of *IFNT2* genes on bovine embryos produced *in vitro*  
577 (day 7;  $n = 8$  embryos/group) under SN (a) and SP conditions (b) during IVM from all IVM  
578 groups; and under SN (c) and SP conditions (d) during *in vitro* fertilization and embryo  
579 culture from all IVC groups. Bars represent the group mean  $\pm$  SEM for five replicates.  
580 Different letters indicate statistical significance among groups ( $P < 0.05$ ).

581

582 **Figure 5:** Relative mRNA expression of genes associated with oxidative stress on bovine  
583 embryos produced *in vitro* (day 7;  $n = 8$ ) under SN (a-d) and SP conditions (e-h) during

584 oocyte maturation (IVM groups). (a) *CAT*, (b) *GPX*, (c) *SOD1*, (d) *SOD2*, (e) *CAT*, (f) *GPX*,  
585 (g) *SOD1*, and (h) *SOD2*. Bars represent the group mean  $\pm$  SEM for five replicates.

586

587 **Figure 6:** Relative mRNA expression of genes associated with oxidative stress on bovine  
588 embryos produced *in vitro* (day 7;  $n = 8$ ) under SN (a-d) and SP conditions (e-h) during  
589 oocyte fertilization and embryo culture (IVC groups). (a) *CAT*, (b) *GPX*, (c) *SOD1*, (d) *SOD2*,  
590 (e) *CAT*, (f) *GPX*, (g) *SOD1*, and (h) *SOD2*. Bars represent the group mean  $\pm$  SEM for five  
591 replicates. Different letters indicate statistical significance among groups ( $P < 0.05$ ).

592

593 **Figure 7:** Relative mRNA expression of gene associated with cellular stress *HSP90AA1*  
594 (*HSP90*) on bovine embryos produced *in vitro* (day 7;  $n = 8$ ) under SN (a) and SP conditions  
595 (b) during oocyte maturation (IVM groups), and under SN (c) and SP conditions (d) during  
596 oocyte fertilization and embryo culture (IVC groups). Bars represent the group mean  $\pm$  SEM  
597 for five replicates. Different letters indicate statistical significance among groups ( $P < 0.05$ ).

598

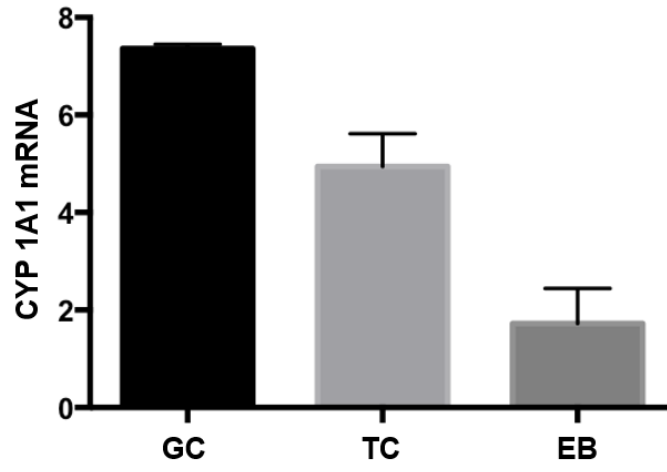
599 **Tables**600 **Table 1.** Primers designed for quantitative real-time PCR analysis.

<b>Target</b>	<b>Accession number</b>	<b>Primer sequence</b>
IFNT2	NM_001015511.3	F: TCTGAGGACCACATGCTAGG R: GATCCTTCTGGAGCTGGTTG
HSP90AA1	NM_001033602.2	F: GAGGAAACACTCTCGGACGG R: TCGGTCTTGCTGCTCCATAC
SOD1	NM_174615.2	F: ATACACAAGGCTGTACCAGTGC R: CACATTGCCAGGTCTCCAA
SOD2	NM_201527.2	F: CCCATGAAGCCTTTCTAATCCTG R: TTCAGAGGCGCTACTATTTCCCTTC
GPX1	NM_174076.3	F: GCATCAGGAAAACGCCAAGA R: CCATTCACCTCGCACTTTTCG
CAT	NM_001035386.1	F: AGAGGAAACGCCTGTGTGAG R: ATGCGGGAGCCATATTCAGG
GAPDH	NM_001034034.2	F: GATTGTCAGCAATGCCTCCT R: GGTCATAAGTCCCTCCACGA
RPS18	NM_001033614.2	F: CCTTCCGCGAGGATCCATTG R: CGCTCCCAAGATCCAACACTAC
CYP1A1	NM_AB060696	F: TCGGGCACATGCTGATGTTG R: GCACAGATGACATTGGCCACTG

601 F: Forward; R: Reverse.

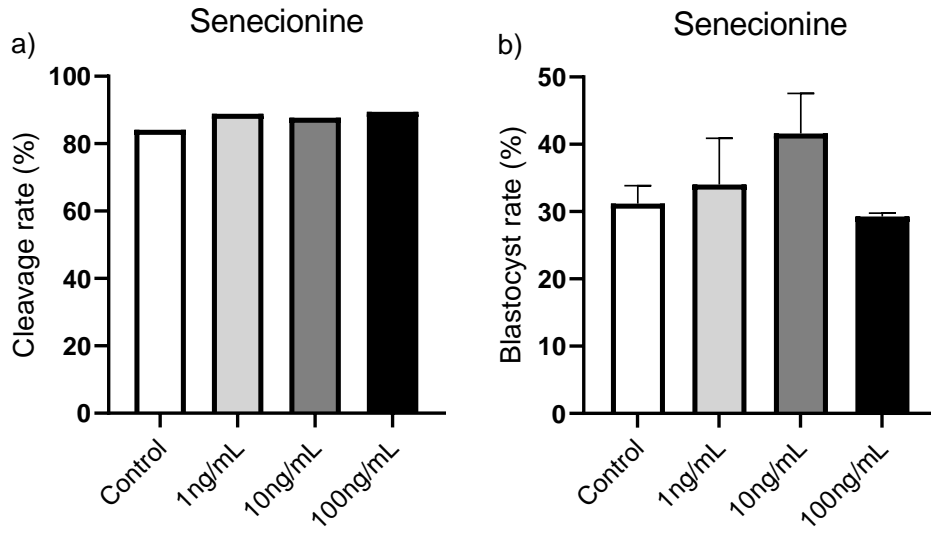
602 **Figures**

603 **Figure 1:**

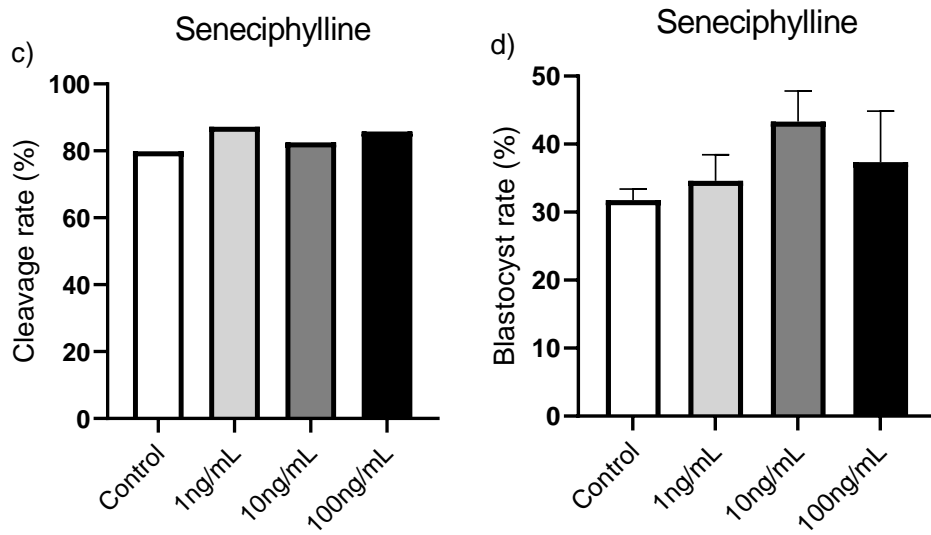


604

605 **Figure 2:**

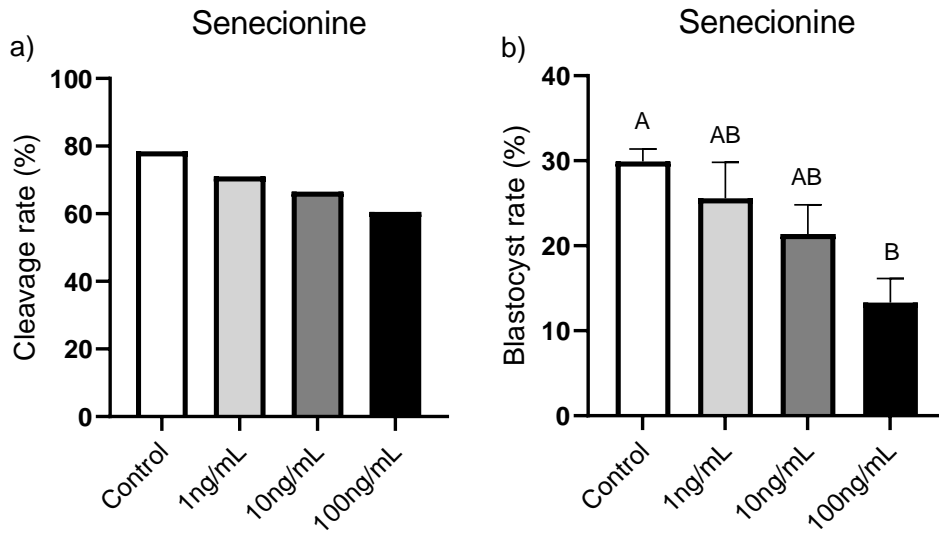


606

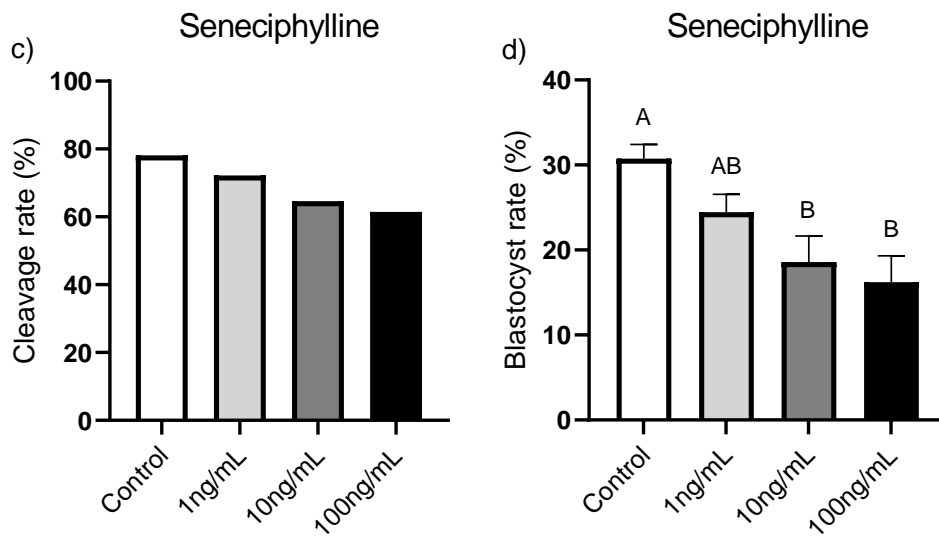


607

608 **Figure 3:**

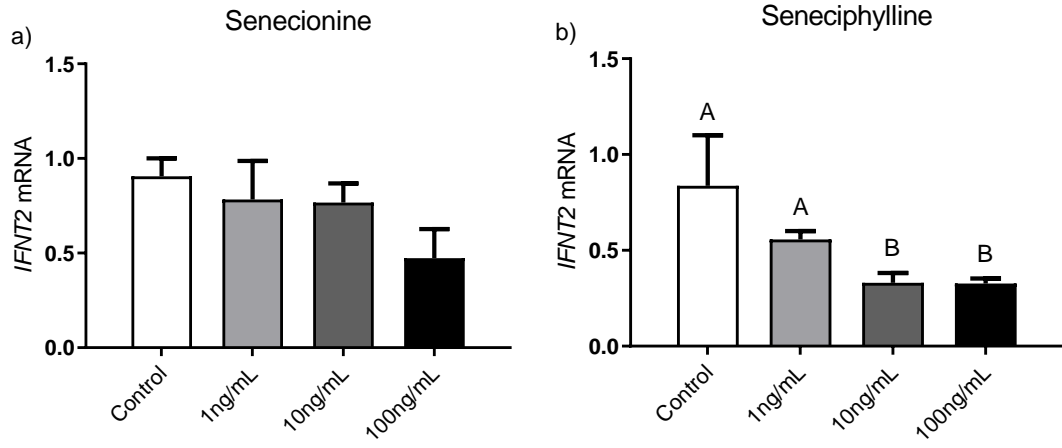


609

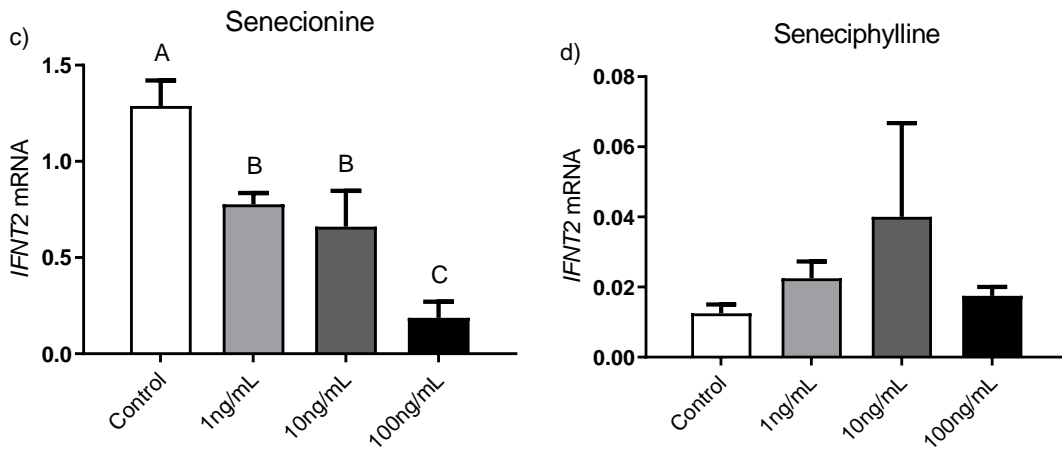


610

611 **Figure 4:**



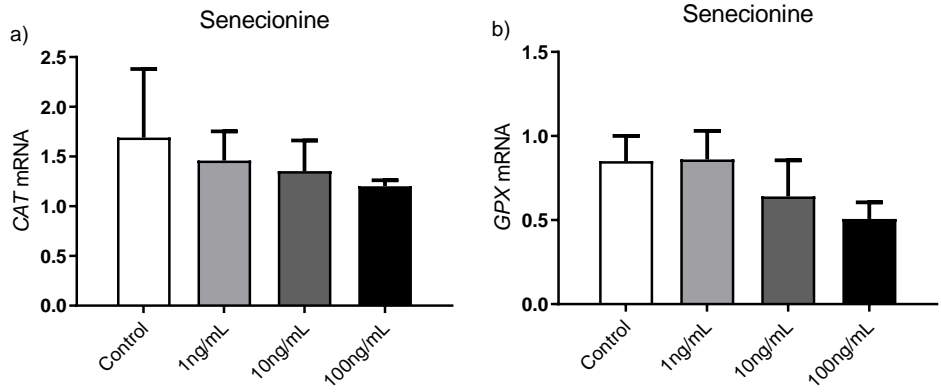
612



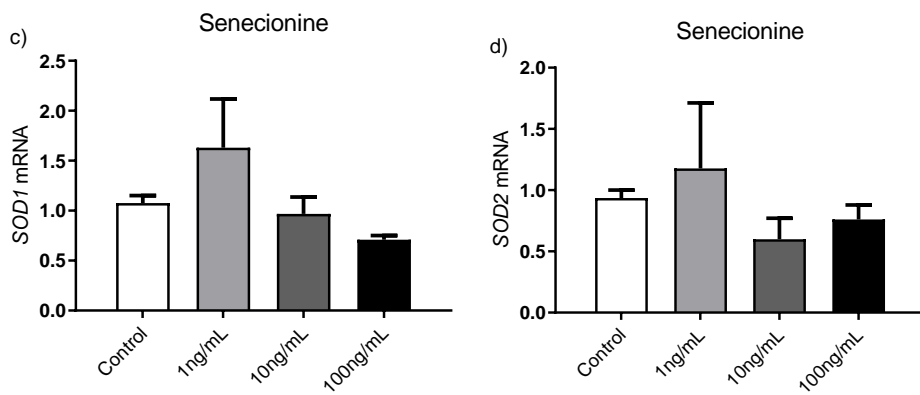
613



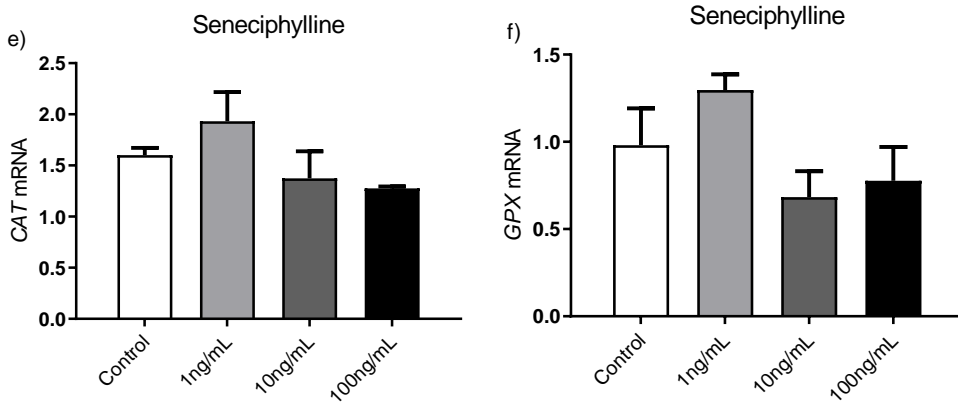
614 **Figure 5:**



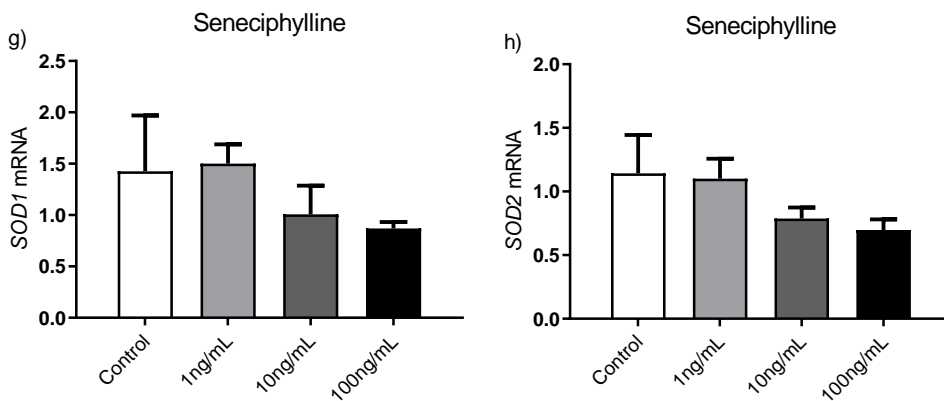
615



616

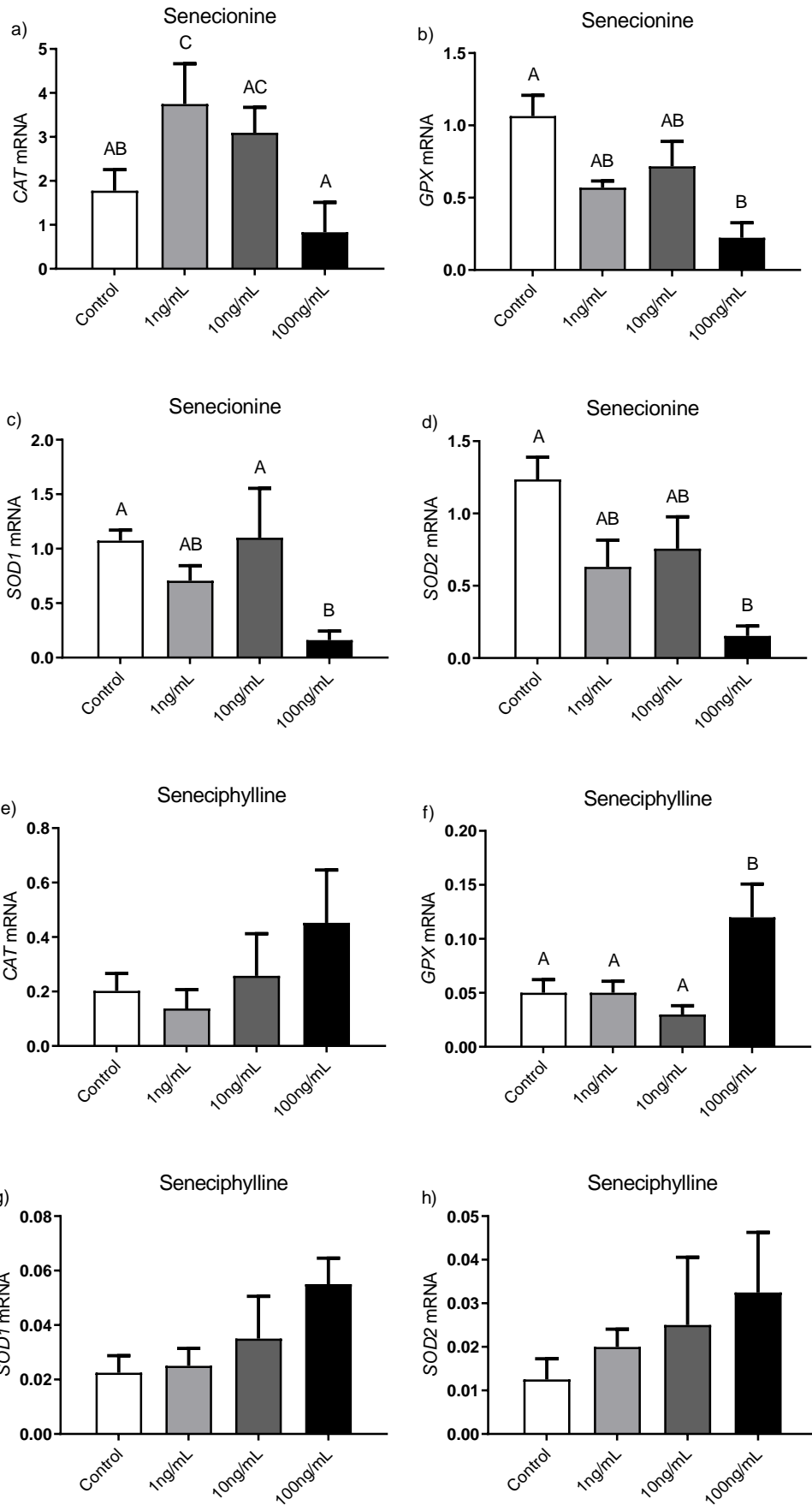


617



618

619 **Figure 6:**



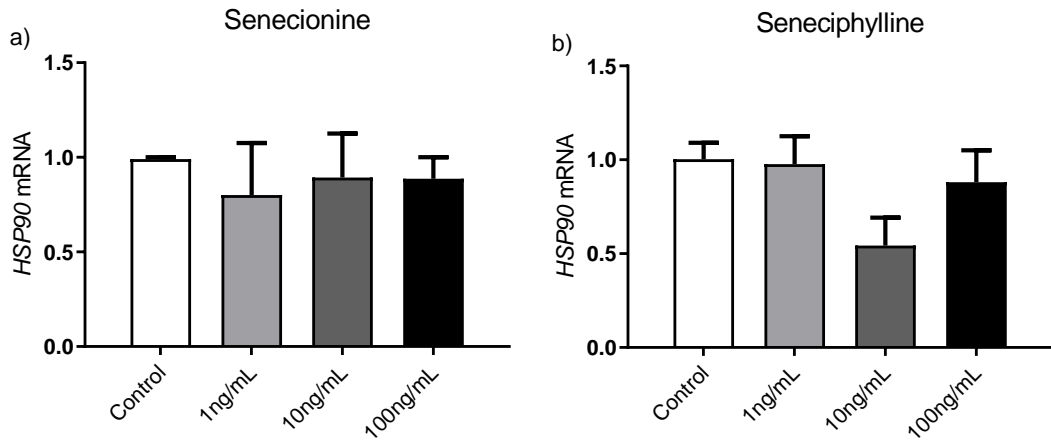
620

621

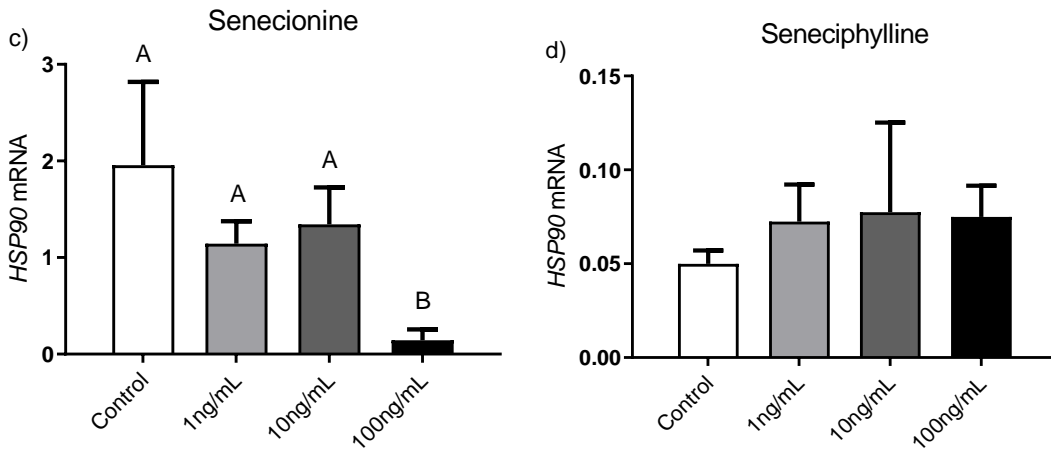
622

623

624 **Figure 7:**



625



626

## 4 CONCLUSÃO

Os alcalóides pirrolizidínicos (PAs), senecionina (SN) e senecifilina (SP), prejudicam a expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo e *IFNT* em embriões bovinos produzidos *in vitro*, possivelmente afetando a reprodução de bovinos. Os resultados apresentados aqui nos permitem concluir que a intoxicação por alcalóides pirrolizidínicos prejudicam o desenvolvimento embrionário inicial durante a maturação (IVM), e cultivo *in vitro* (IVC). Embora as taxas de clivagem e blastocistos não tenham sido afetadas, a intoxicação por SP, causou a redução da expressão de *IFNT*, dose dependente (100 ng/ml), durante a maturação oocitária. Além disso, ambos alcalóides, especialmente SN, afetaram a expressão de genes para *IFNT*, enzimas antioxidantes e sobrevivência celular. Portanto, nossos resultados sugerem que a intoxicação por *Senecio* spp. prejudica o desenvolvimento embrionário inicial em bovinos através da modulação da expressão de genes relacionados ao *IFNT*, estresse oxidativo e sobrevivência celular.

## REFERÊNCIAS

- ANTONIAZZI, A. Q. et al. The role of interferon-tau during maternal recognition of pregnancy in ruminants. **Ciencia Rural**, v. 41, n. 1, p. 176–185, 2011.
- ANTONIAZZI, A. Q. et al. Endocrine delivery of interferon tau protects the corpus luteum from prostaglandin F2 alpha-induced luteolysis in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 6, p. 144, 2013.
- ASCARI, I. J. et al. Addition of insulin-like growth factor I to the maturation medium of bovine oocytes subjected to heat shock: effects on the production of reactive oxygen species, mitochondrial activity and oocyte competence. **Domestic animal endocrinology**, v. 60, p. 50–60, 1 jul. 2017.
- AUSTIN, K. J. et al. Ubiquitin cross-reactive protein is released by the bovine uterus in response to interferon during early pregnancy. **Biology of reproduction**, v. 54, n. 3, p. 600–606, mar. 1996.
- BANDYOPADHYAY, S. et al. Cytotoxicity of Senecio in macrophages is mediated via its induction of oxidative stress. **Research in Veterinary Science**, v. 87, n. 1, p. 85–90, 2009.
- BARROS, C. S. L. et al. Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por Senecio brasiliensis (Asteraceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 27, n. 1, p. 53–60, jan. 2007.
- BAYNES, J. W. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. **Diabetes**, v. 40, n. 4, p. 405–412, 1991.
- BAZER, F. W. et al. **Role of conceptus secretory products in establishment of pregnancy** *Journal of Reproduction and Fertility*, 1986.
- BAZER, F. W. et al. Physiological mechanisms of pregnancy recognition in ruminants. **Journal of Reproduction and fertility. Supplement**, v. 43, p. 39–47, 1 jan. 1991.
- BERTAN, C. M. et al. Endocrine and molecular mechanisms involved in the formation of corpus luteum and luteolysis: a review. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 824–840, 1 dez. 2006.
- BINELLI, M. et al. Bovine interferon-tau stimulates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway in bovine endometrial epithelial cells. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 2, p. 654–665, 2001.
- BLONDIN, P.; COENEN, K.; SIRARD, M. A. The impact of reactive oxygen species on bovine sperm fertilizing ability and oocyte maturation. **Journal of Andrology**, v. 18, n. 4, p. 454–460, 1997.
- BÓ, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Evaluation and classification of bovine embryos. **Anim. Reprod.**, v. 10, n. 3, p. 344–348, 26 jul. 2013.

BOSI, C. F. et al. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *Ageratum conyzoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 425–432, 2013.

BOTT, R. C. et al. Uterine vein infusion of Interferon Tau (IFNT) extends luteal life span in ewes. **Biology of Reproduction**, v. 82, n. 4, p. 725–735, 2010.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **Biochemical Journal**, v. 134, n. 3, p. 707–716, 1973.

CHIHUAILAF, R. H.; CONTRERAS, P. A.; WITTEWER, F. G. Pathogenesis of oxidative stress: Consequences and evaluation in animal health. **Veterinaria México**, v. 33, n. 3, p. 265–283, 2002.

CLEMENTE, M. et al. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 138, n. 3, p. 507–517, set. 2009.

DE SOUZA, R. R. et al. Modulatory effect of *Senecio brasiliensis* (Spreng) Less. in a murine model of inflammation induced by carrageenan into the pleural cavity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 168, p. 373–379, 15 mar. 2009.

DEMMERS, K. J.; DERECKA, K.; FLINT, A. Trophoblast interferon and pregnancy. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 121, n. 1, p. 41–49, 2001.

ELIAS, F. et al. Haematological and immunological effects of repeated dose exposure of rats to integerrimine N-oxide from *Senecio brasiliensis*. **Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 49, n. 9, p. 2313–2319, set. 2011.

FARIN, C. E. et al. Expression of trophoblastic interferon genes in sheep and cattle. **Biology of Reproduction**, v. 43, n. 2, p. 210–218, 1990.

GRECCO, F. B. et al. Aspectos epidemiológicos e padrões de lesões hepáticas em 35 surtos de intoxicação por *Senecio* spp. em bovinos no sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 30, n. 5, p. 389–397, maio 2010.

GUO, C. Y. et al. Oxidative stress, mitochondrial damage and neurodegenerative diseases. **Neural regeneration research**, v. 8, n. 21, p. 2003–2014, 25 jul. 2013.

HAN, H. et al. Low blood ISG15 mRNA and progesterone levels are predictive of non-pregnant dairy cows. **Journal of Endocrinology**, v. 191, n. 2, p. 505–512, nov. 2006.

HIRAYAMA, H. et al. Enhancement of maternal recognition of pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer. **Theriogenology**, v. 81, n. 8, p. 1108–1115, 2014.

HUAN, J. Y. et al. Species differences in the hepatic microsomal enzyme metabolism of the pyrrolizidine alkaloids. **Toxicology Letters**, v. 99, n. 2, p. 127–137, 15 out. 1998.

IMAKAWA, K. et al. Temporal expression of type I interferon receptor in the peri-implantation ovine extra-embryonic membranes: demonstration that human IFN $\alpha$  can bind to this receptor. **Endocrine journal**, v. 49, n. 2, p. 195–205, 2002.

JOHNSON, G. A. et al. Pregnancy and interferon-tau induce conjugation of bovine ubiquitin cross-reactive protein to cytosolic uterine proteins. **Biology of reproduction**, v. 58, n. 4, p. 898–904, abr. 1998.

KARAM, F. C.; SCHILD, A. L.; DE MELLO, J. R. B. Intoxicação por Senecio spp. em bovinos no Rio Grande do Sul: condições ambientais favoráveis e medidas de controle. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 7, p. 603–609, 2011.

KARAM, F. S. C. et al. Aspectos epidemiológicos da seneciose na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 24, n. 4, p. 191–198, 2004.

KIFFIN, R. et al. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. **Molecular Biology of the Cell**, v. 15, n. 11, p. 4829–4840, nov. 2004.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. 2. ed. São Paulo: BASF, 2000.

KIZAKI, M. et al. Induction of Apoptosis via the Modulation of Reactive Oxygen Species (ROS) Production in the Treatment of Myeloid Leukemia. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 323–329, 27 set. 2006.

KRABBE, A. A. et al. Megalocitose de células luteínicas grandes de vacas prenhes com seneciose crônica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 1, p. 33–38, 2015.

KUBISCH, H. M.; LARSON, M. A.; ROBERTS, R. M. Relationship between age of blastocyst formation and interferon- $\tau$  secretion by in vitro-derived bovine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 49, n. 3, p. 254–260, 1998.

LI, Y. et al. Resveratrol compares with melatonin in improving in vitro porcine oocyte maturation under heat stress. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 3 jun. 2016.

LIU, W. et al. Differential induction of apoptosis and autophagy by pyrrolizidine alkaloid clivorine in human hepatoma Huh-7.5 cells and its toxic implication. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, 1 jun. 2017.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: Terrestres, Aquáticas, Parasitas e Tóxicas**. 4. ed. [s.l.] Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2008.

MCCRACKEN, J. A.; CUSTER, E. E.; LAMSA, J. C. Luteolysis: A neuroendocrine-mediated event. **Physiological Reviews**, v. 79, n. 2, p. 263–323, 1 abr. 1999.

MCLEAN, E. K. **The toxic actions of pyrrolizidine (senecio) alkaloids**. **Pharmacological Reviews**, 1970.

MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F. **Plantas tóxicas e Micotoxicoses**. 2. ed. Pelotas:

Editora e Gráfica Universitária, 2008.

MISHRA, A. et al. l-carnitine Mediated Reduction in Oxidative Stress and Alteration in Transcript Level of Antioxidant Enzymes in Sheep Embryos Produced In Vitro. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 51, n. 2, p. 311–321, 1 abr. 2016.

MORADO, S. A. et al. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation in vitro. **Reproduction, fertility, and development**, v. 21, n. 4, p. 608–614, 2009.

NISWENDER, G. D. et al. Mechanisms controlling the function and life span of the corpus luteum. **Physiological Reviews**, v. 80, n. 1, p. 1–29, 2000.

OLIVEIRA, C. C. DE; SILVA, M. J. DA; TELES, A. M. Senecio L. (Asteraceae, Senecioneae) no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Hoehnea**, v. 42, n. 4, p. 703–724, dez. 2015.

OLIVEIRA, J. F. et al. Expression of interferon (IFN)-stimulated genes in extrauterine tissues during early pregnancy in sheep is the consequence of endocrine IFN- $\tau$  release from the uterine vein. **Endocrinology**, v. 149, n. 3, p. 1252–1259, mar. 2008.

OLIVEIRA, M. C.; CASSAL, A.; PIZARRO, C. B. Avaliação do eixo hipotálamo-hipófise-gônada e prevalência de hipogonadismo central em homens e mulheres com cirrose hepática. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 47, n. 5, p. 593–600, out. 2003.

PARTHIBAN, A. et al. Oxidative stress and the development of diabetic complications - antioxidants and lipid peroxidation in erythrocytes and cell membrane. **Cell Biology International**, v. 19, n. 12, p. 987–994, 1 dez. 1995.

PILATI, C.; BARROS, C. S. L. Intoxicação experimental por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae) em eqüinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 27, n. 7, p. 287–296, 2007.

PRAKASH, A. S. et al. Pyrrolizidine alkaloids in human diet. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 443, n. 1–2, p. 53–67, 15 jul. 1999.

RIBEIRO, E. S. et al. Biology of Preimplantation Conceptus at the Onset of Elongation in Dairy Cows. **Biology of reproduction**, v. 94, n. 4, 1 abr. 2016.

RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T. Intoxicações por plantas em ruminantes no Brasil e no Uruguai: Importância econômica, controle e riscos para a saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 1, p. 38–42, 1 mar. 2001.

ROBERTS, R. M. et al. Interferon production by the preimplantation sheep embryo. **Journal of interferon research**, v. 9, n. 2, p. 175–187, 1989.

ROBERTS, R. M. et al. Trophoblast interferons. **Placenta**, v. 20, n. 4, p. 259–264, 1999.

ROBERTS, R. M. et al. Evolution of the interferon tau genes and their promoters, and maternal-trophoblast interactions in control of their expression. **Reproduction (Cambridge, England) Supplement**, v. 61, p. 239–251, 1 jan. 2003.



ROCHA-FRIGONI, N. A. S. et al. Improving the cytoplasmic maturation of bovine oocytes matured in vitro with intracellular and/or extracellular antioxidants is not associated with increased rates of embryo development. **Theriogenology**, v. 86, n. 8, p. 1897–1905, 1 nov. 2016.

ROMO-ASUNCIÓN, D. et al. Juvenomimetic and Insecticidal Activities of *Senecio salignus* (Asteraceae) and *Salvia microphylla* (Lamiaceae) on *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). <https://doi.org/10.1653/024.099.0301>, v. 99, n. 3, p. 345–351, 1 set. 2016.

SANDINI, T. M.; UDO, M. S. B.; SPINOSA, H. DE S. *Senecio brasiliensis* e alcaloides pirrolizidínicos: toxicidade em animais e na saúde humana. **Biotemas**, v. 26, n. 2, p. 83–92, 13 fev. 2013.

SANTOS, J. C. A. et al. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 1–14, 2008.

SHKOLNIK, K. et al. Reactive oxygen species are indispensable in ovulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 4, p. 1462–1467, 25 jan. 2011.

SIMÕES, R. et al. Influence of bovine sperm DNA fragmentation and oxidative stress on early embryo in vitro development outcome. **Reproduction (Cambridge, England)**, v. 146, n. 5, p. 433–441, nov. 2013.

SLIMEN, I. B. et al. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. **International Journal of Hyperthermia**, v. 30, n. 7, p. 513–523, 1 nov. 2014.

SOYSAL, P. et al. Oxidative stress and frailty: A systematic review and synthesis of the best evidence. **Maturitas**, v. 99, p. 66–72, 1 maio 2017.

SPENCER, T. E. et al. Pregnancy recognition and conceptus implantation in domestic ruminants: roles of progesterone, interferons and endogenous retroviruses. **Reproduction, fertility, and development**, v. 19, n. 1, p. 65–78, 2007.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Ovine interferon tau suppresses transcription of the estrogen receptor and oxytocin receptor genes in the ovine endometrium. **Endocrinology**, v. 137, n. 3, p. 1144–1147, 1996.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. **Biology of progesterone action during pregnancy recognition and maintenance of pregnancy.** *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* Front Biosci, , 2002. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12161340/>>. Acesso em: 25 jan. 2022

SPONCHIADO, M. et al. Pre-hatching embryo-dependent and -independent programming of endometrial function in cattle. **PLOS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175954, 1 abr. 2017.

STEFANELLO, S. et al. Evaluation of interferon-stimulated gene 15 (ISG15) expression in blood neutrophils in beef cattle poisoned by *Senecio* spp.1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**,

v. 41, 23 jul. 2021.

TAKAHASHI, M. et al. Promoting Effect of  $\beta$ -Mercaptoethanol on In Vitro Development under Oxidative Stress and Cystine Uptake of Bovine Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 3, p. 562–567, 1 mar. 2002.

THATCHER, W. W.; MEYER, M. D.; DANET-DESNOYERS, G. Maternal recognition of pregnancy. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 49, p. 15–28, 1995.

TRIGO, J. R. et al. Chemotaxonomic value of pyrrolizidine alkaloids in southern Brazil Senecio (Senecioneae: Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 9, p. 1011–1022, 1 set. 2003.

TURRENS, J. F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. **Journal of Physiology**, v. 552, n. 2, p. 335–344, 15 out. 2003.

UCHIKURA, K. et al. Lipopolysaccharides induced increases in Fas ligand expression by Kupffer cells via mechanisms dependent on reactive oxygen species. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 287, n. 3 50-3, p. G620–G626, set. 2004.

WANG, X. L. et al. A potential autocrine role for interferon tau in ovine trophectoderm. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 48, n. 5, p. 819–825, out. 2013.