

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS IN VITRO
SUPLEMENTADOS COM L-CARNITINA EM DIFERENTES
TENSÕES DE OXIGÊNIO NO CULTIVO.

Acadêmica: Daniela Moraes Pereira

Aquidauana-MS
Junho/2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE AQUIDAUANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS IN VITRO
SUPLEMENTADOS COM L-CARNITINA EM DIFERENTES
TENSÕES DE OXIGÊNIO NO CULTIVO.

Acadêmica: Daniela Moraes Pereira
Orientadora: Prof.^a Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza

“Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia”

Aquidauana-MS
Junho/2019

P49p Pereira, Daniela Moraes

Produção de embriões bovinos *in vitro* suplementados com L-carnitina em diferentes tensões de oxigênio no cultivo/
Daniela Moraes Pereira. – Aquidauana, MS: UEMS, 20019.
49f.

Dissertação (Mestrado) – Zootecnia – Universidade
Estadual de Mato Grosso do Sul, 2019.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza.

1. Embriões bovinos 2. Estresse oxidativo 3. PIVE I.
Sterza, Fabiana de Andrade Melo II. Título

CDD 23. ed. - 636.2



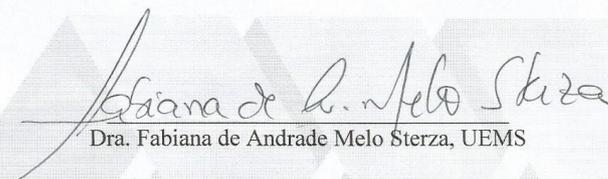
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Área de Concentração: Produção Animal

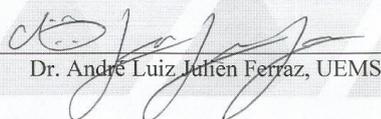


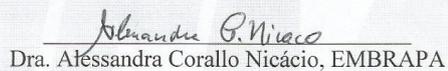
DANIELA MORAES PEREIRA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, área de concentração em Produção Animal no Cerrado-Pantanal, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 19/06/2019.


Dra. Fabiana de Andrade Melo Sterza, UEMS


Dr. André Luiz Julien Ferraz, UEMS


Dra. Alessandra Corallo Nicácio, EMBRAPA

A minha família, pelo amor incondicional.
Aos meus verdadeiros amigos que sempre torceram por mim.
Dedico esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus...

... Que me ensinou da forma mais triste, que a maneira mais simples que temos de conseguir nossos objetivos e sonhos, é somente confiando Nele. Que me mostrou que, mesmo com todos os problemas que possuímos sempre existe alguém mais fraco que nós, por isso é nossa obrigação lutar. Agradeço a Deus por ter me reerguido a cada desespero que passei nos últimos anos, por ter me carregado em Seus braços toda vez que O chamei e principalmente por ter me fortalecido todos esses dias.

À minha filha, meu amor maior, fonte de todos os meus sonhos e objetivos a serem alcançados. Meus pais Flávio e Marilene, e minha amada irmã Flávia, pelo apoio, conforto, paciência e por nunca ter me deixado desistir quando eu via que não conseguiria mais. À minha madrasta Ana Luiza e ao meu padrasto Rodrigo por sempre ter comemorado minhas conquistas e a minha irmãzinha Sarah.

À minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. Fabiana de Andrade Melo-Sterza, pela orientação, palavras de aprendizados e pela ajuda em todos os momentos.

Ao meu namorado Renato, pelo apoio, paciência em vários momentos que não foram fáceis, pelas palavras de incentivo, pelo amor e cuidado que teve comigo nesse tempo. Muito obrigada, te amo.

Aos meus avós Antônia Lúcia e Pedro Natércio (in memoriam) pelo amor incondicional que sempre me deram, e em especial, a minha querida e eterna “madrinha” Dona Elvira (in memoriam) pela suprema dedicação à minha infância, e por ter sido o meu amor mais puro.

À Lúcia, que além de ser avó da minha princesa é uma mãe que a vida me deu, sempre disposta a me ajudar, não medindo esforços.

Às minhas amigas Natana e Lívia, pelo carinho, dedicação e por ter entendido a minha falta.

Agradeço aos meus amigos do Gentra, Mariana amiga que Deus me deu para cuidar, me ensina muito com sua vida nada fácil. A Mirela por ter me ajudado no experimento, sem ela nada teria acontecido. Aldair, Silvinho, Jana, Giovanna, Bini, Gean, obrigada!!

Agradeço em especial ao Christopher, pessoa de um coração enorme, sem ele não teria conseguido concluir meu mestrado. Obrigada pelos puxões de orelha, pelas

palavras duras e ao mesmo tempo de amor, pois foram com elas que eu cresci. Você é uma pessoa maravilhosa, e eu tenho certeza que seus sonhos serão atingidos!! Thanks friend!

A minha amiga Paloma, pelo incentivo, pelo companheirismo, por tudo que você agrega em minha vida.

À Universidade, pelo curso e pós graduação oferecido, a todos os meus professores que contribuíram para a minha carreira profissional, e a toda equipe GENTRA, pelo fornecimento e ajuda com a colheita com os ovários.

Ao frigorífico Buriti de Aquidauana/MS e todos os animais que contribuíram para a realização do meu experimento.

A todas as pessoas, que contribuíram de alguma forma nesse trabalho e sempre estiveram torcendo por mim.

Muito Obrigada!!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO:	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	Desenvolvimento embrionário <i>in vivo</i> e sua morfologia	11
2.2	Desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i>	13
2.2.2	Fertilização <i>in vitro</i>	14
2.2.3	Cultivo <i>in vitro</i>	15
2.3	Diferenças entre embriões produzidos <i>in vitro</i> e produzidos <i>in vivo</i>	15
2.4	Espécies reativas de oxigênio, sua relação com o estresse oxidativo e seus efeitos na produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos	16
2.5	Antioxidantes	17
2.6	L-carnitina	18
2.7	Tensão de oxigênio da incubadora	20
2.8	Óxido Nítrico	20
3	OBJETIVOS	21
3.1	Objetivo Geral	21
3.2	Objetivos Específicos	21
3.1	REFERENCIA BIBLIOGRAFICA:	22
	CAPITULO 2*- Production of <i>in vitro</i> bovine embryos supplemented with L-carnitine in different oxygen tensions and the relation to nitric oxide	33
	Introduction	34
	Materials and methods	36
	Statistical analysis	38
	Results	39
	Discussion	39
	Conclusion	42
	References	42

RESUMO: A fertilização *in vitro* está muito bem consolidada, mas a busca por novas ferramentas para melhorar os resultados é frequente. Os antioxidantes foram estudados por muitos pesquisadores, pois seus efeitos podem ser cruciais para diminuir o efeito oxidativo, que é uma realidade dos embriões produzidos *in vitro*. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a produção de embriões bovinos *in vitro* quando suplementado com L-carnitina por 24 horas, a partir do dia 5 (D5), sob 2 diferentes tensões de oxigênio (20% ou 5%) e a relação do óxido nítrico (NO) no meio IVC com desenvolvimento embrionário. Os complexos cumulus-oócitos (COC; n= 837) foram maturados *in vitro* por 24 horas e a fertilização foi realizada por 18 horas. Os zigotos foram cultivados *in vitro* por 9 dias após a fertilização *in vitro* em meio SOF com soro fetal bovino a 5% (FCS). Em D5, as placas foram atribuídas a 1 de 4 grupos de tratamento: tensão de O₂ alta (20%) ou baixa (5%) com ou sem a adição de 3,03 mM de L-carnitina (alta-contrôle, alta-Lcar, baixa-Contr, baixa-Lcar). Nos dias 5, 6 e 9 foi avaliada a concentração de NO no meio de cultura. Parte dos embriões foi submetida à avaliação de gotículas lipídicas intracelulares no D7. A taxa de clivagem foi semelhante ($P > 0,05$) entre alta e baixa tensão de O₂ e a taxa de blastocisto foi semelhante em todas as condições avaliadas. A taxa de eclosão foi mais alta ($P < 0,05$) para o baixa-Contr e a concentração de NO para o baixa-Contr foi maior no dia 9 ($p < 0,05$). A adição de 3,03 mM de L-carnitina entre D5 e 6 na CIV não foi eficiente na redução do conteúdo lipídico citoplasmático de embriões bovinos. Além disso, a CIV em baixa tensão de oxigênio sem L-carnitina promove melhores condições para o desenvolvimento embrionário quando houve maior concentração de NO no meio.

Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário; estresse oxidativo; PIVE

ABSTRACT: The *in vitro* fertilization is very well consolidated but the search for new tools to improve the results are frequent. The antioxidants have been studied by many researchers as its effects can be crucial to decrease the oxidative effect, which is a reality of embryos produced *in vitro*. Therefore, the aim of this study was to evaluate the production of bovine embryos *in vitro* when supplemented with L-carnitine for 24 h beginning on day 5 (D5) under 2 different oxygen tensions (20% or 5%) and the relationship of nitric oxide (NO) in the IVC medium with embryo development. The Cumulus-Oocyte-Complexes (COC; n = 837) were matured *in vitro* for 24 hours and fertilization was performed for 18 hours. The zygotes were cultured *in vitro* for 9 days after IVF in SOF medium with 5% Fetal Calf Serum (FCS). At d5 the plates were assigned to 1 of 4 treatment groups: high (20%) or low (5%) O₂ tension either with or without the addition of 3.03 mM L-carnitine (High-Contr, High-Lcar, Low-Contr, Low-Lcar). On d 5, 6 and 9 the concentration of NO in the culture medium was evaluated. A part of the embryos was submitted to evaluation of intracellular lipid droplets on d 7. The cleavage rate was similar ($P > 0.05$) between high and low O₂ tension and the blastocyst rate was similar in all conditions evaluated. The hatching rate was higher ($P < 0.05$) for Low-Contr and the NO concentration for Low-Contr was higher at d 9 ($P < 0.05$). The addition of 3.03 mM L-carnitine between d 5 and 6 of IVC was not efficient in reducing cytoplasmic lipid content of bovine embryos. Additionally, IVC at a low oxygen tension without L-carnitine promotes better conditions for embryo development when there was higher NO concentration in the medium.

Keywords: embryonic development; Nile red; nitric oxide; bovine.

1 CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

3 1 INTRODUÇÃO:

4 Nos últimos 80 anos, a introdução das biotecnologias reprodutivas possibilitou uma
5 maior eficiência e rentabilidade aos produtores e empresas de reprodução animal (BLONDIN,
6 2015). Dessa forma se intensificou o estudo e o desenvolvimento de biotecnologias como
7 produção *in vitro* (PIV), criopreservação e micromanipulação de embriões.

8 A aplicação dessas biotecnologias, nas espécies de interesse zootécnico,
9 principalmente a PIV e a criopreservação, possui um mercado atrativo. Segundo o último
10 levantamento realizado em 2015 e publicado em 2017, o Brasil é o maior produtor mundial de
11 embriões PIV, apontando uma produção total de 375.894 embriões, dos quais 353.539
12 embriões PIV (VIANA et al., 2017).

13 O uso de embriões aumentou 726,5% nos últimos 20 anos no Brasil, porém ainda
14 representam apenas 0,33% do número de vacas e novilhas em idade reprodutiva, colocando o
15 país em 11ª posição do ranking, ficando atrás do Canadá, EUA e vários países europeus
16 (VIANA et al., 2017).

17 A PIV apresenta-se como uma das principais ferramentas de grande potencial
18 multiplicador de indivíduos de alto potencial genético. As biotecnologias têm como o intuito
19 maximizar o potencial reprodutivo e se faz necessária na cadeia produtiva de carne e leite.
20 Nesse sentido, a PIV representa uma alternativa importante para disseminar a genética
21 (HANSEN 2006).

22 Várias pesquisas estão sendo desenvolvidas, com grandes avanços, visando uma
23 melhoria nas condições de maturação, fecundação e desenvolvimento embrionário *in vitro*
24 (ASSUMPCÃO et al., 2002), pois os embriões PIV apresentam qualidade inferior àqueles
25 produzido *in vivo* (CHAVES et al., 2010). A menor qualidade dos embriões PIV pode estar
26 relacionada com a qualidade dos meios de cultivo (LONERGAN et al., 2000), e ao ambiente
27 atmosférico (YANG et al., 1998).

28 No Brasil em geral, a PIVE é realizada em incubadoras de alta tensão de oxigênio
29 (5% de dióxido de carbono (CO₂) e 20% de oxigênio atmosférico (O₂), por apresentar um
30 menor custo quando comparado com o sistema de incubadoras de baixa tensão de oxigênio
31 atmosférico (5% CO₂, 5% O₂, 20% N₂ (SOVERNIGO et al., 2017)).

32 A exposição dos oócitos e/ou embriões a altos níveis atmosféricos de O₂ possibilita o
33 aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS do inglês *reactive oxygen*
34 *species*), que podem causar lesões (ROCHA-FRIGONI et al., 2016). Com isso, o uso de

35 antioxidantes durante a PIV pode evitar o aumento excessivo de ROS e melhorar a eficiência
36 e a qualidade dos embriões (KERE et al., 2012).

37 Neste sentido, a L-carnitina vem sendo pesquisada na PIV pelo seu comportamento
38 em transferir ácidos graxos livres de cadeia longa do citosol para mitocôndrias, onde serão
39 oxidados, promovendo a geração de adenosina trifosfato (ATP). Além de promover efeito
40 sobre a β -oxidação, embriões suplementados com L-carnitina sofrem menos com o estresse
41 oxidativo, devido a neutralização dos radicais livres e consequente diminuição do acúmulo de
42 ROS e da apoptose (WU et al., 2011).

43 **2 REVISÃO DE LITERATURA**

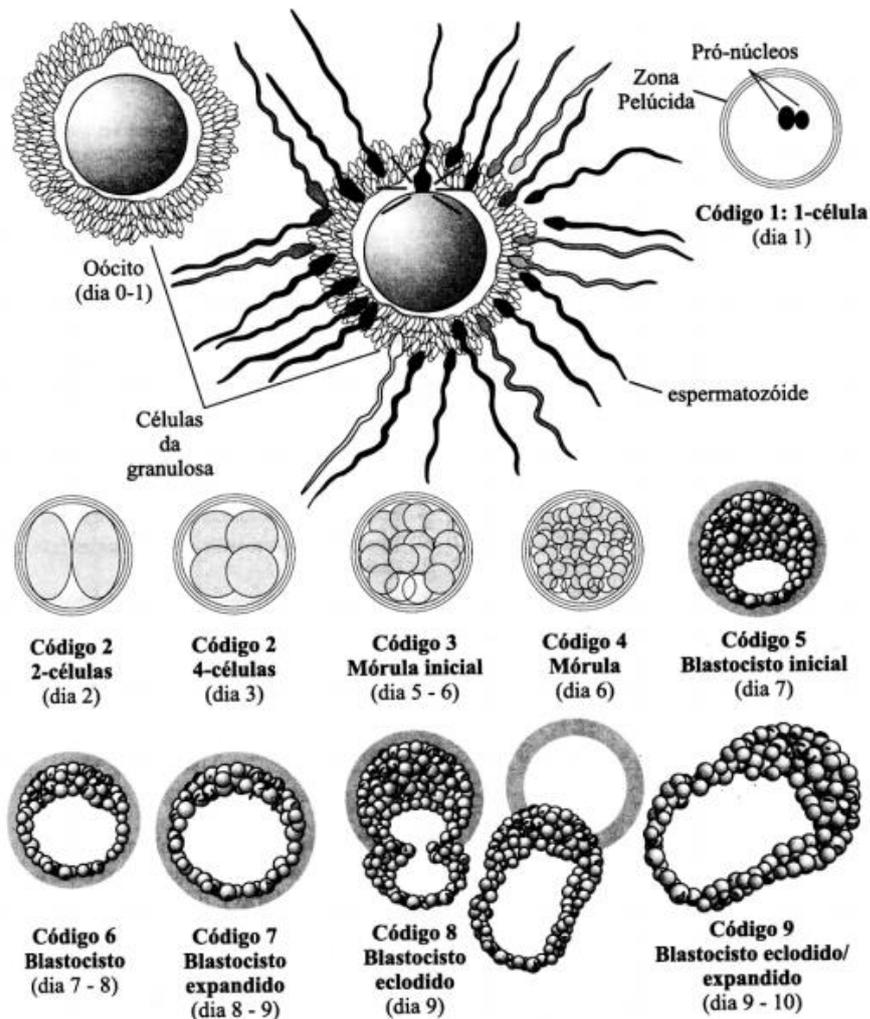
2.1 Desenvolvimento embrionário *in vivo* e sua morfologia

44 O desenvolvimento embrionário bovino (Figura 1) inicia-se entre 20 a 24 horas após
45 a fecundação com a formação do zigoto, ocorrendo a divisão mitótica dentro da zona
46 pelúcida, desta divisão se formará um embrião com duas células, as quais são chamadas de
47 blastômeros (MELVIN;REECE, 1996). Diversas divisões mitóticas ocorrem até que o
48 embrião alcance o número de 16 blastômeros, chamado de mórula, ocorrendo em média entre
49 5 a 6 dias após a fecundação. Neste estágio é difícil discernir um blastômero e a massa celular
50 do embrião ocupa a maior parte do espaço perivitelíneo (HAFEZ;HAFEZ, 2004).

51

52

Figura 1- Estádios de desenvolvimento embrionário em fêmeas bovina.



53 Fonte: Guido (2017).

54 Posteriormente, uma cavidade cheia de líquido se forma dentro da mórula,
 55 denominada blastocele. Com o desenvolvimento do embrião, a blastocele torna-se mais
 56 proeminente e a diferenciação da massa celular interna e das células do trofoblasto torna-se
 57 mais evidente, o que ocorre entre os dia 7 e 8 (BO;MAPLETOFT, 2013; MELVIN;REECE,
 58 1996).

59 Com o aumento do diâmetro do embrião, a zona pelúcida vai se tornando mais
 60 delgada, Entre os dias 9 e 11 o blastocisto passa a ser chamado de blastocisto expandido. Com
 61 a completa eclosão da zona pelúcida, o blastocisto expandido passa a ser chamado de
 62 blastocisto eclodido (HAFEZ;HAFEZ, 2004).

63 Os embriões são classificados em graus I a IV de acordo com a IETS Grau I
 64 (excelente ou bom): Os embriões possuem uma massa simétrica e esférica com blastômeros
 65 individuais que são uniformes em tamanho, cor e densidade. Grau II (bom): Estes embriões
 66 têm irregularidades moderadas na forma geral da massa embrionária ou no tamanho. Grau III

67 (regular): Esses embriões apresentam grandes irregularidades na forma da massa embrionária
68 ou no tamanho. Grau IV (ruim): Muitos fragmentos ou debris celulares no espaço perivitelino,
69 vesículas maiores e em maior número e claras mudanças degenerativas nos blastômeros, com
70 menos da metade da massa celular intacta (BO;MAPLETOFT, 2013).

2.2 Desenvolvimento embrionário *in vitro*

71 Vários estudos já apontaram que o sistema de desenvolvimento embrionário *in vitro*
72 não apresenta a mesma eficiência quando comparado com o *in vivo*. Com isso, várias
73 pesquisas comparativas têm sido realizadas para mostrar as importantes diferenças na
74 estrutura, morfologia, metabolismo, na bioquímica e na expressão de genes (KNIJN et al.,
75 2003).

76 Embriões produzidos *in vitro* (PIV) apresentam menores taxas de clivagem e
77 blastocistos, assincronia na formação dos pronúcleos masculino e feminino, o que resulta em
78 menores taxas de prenhez (VAN WAGTENDONK-DE LEEUW et al., 2000).

79 A PIVE é compreendida por três etapas desenvolvidas em laboratório: maturação
80 oocitária *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV).

81 2.2.1 Maturação *in vitro*

82 A maturação *in vitro* de oócitos bovinos tem duração de 24 horas. Ao longo desse
83 período os oócitos passam por diversas alterações nucleares e citoplasmáticas para que sejam
84 capazes de ser fecundados e, subsequentemente venham a desenvolver-se até o estágio de
85 blastocisto (LONERGAN et al., 2003). Durante seu desenvolvimento, o oócito encontra-se no
86 estágio de diplóteno da prófase I ou estágio de vesícula germinativa, até pouco antes da
87 ovulação. O reinício da meiose *in vivo* pode ser observado por um estímulo hormonal
88 (BILODEAU-GOESEELS, 2006). Nos processos *in vitro* os oócitos retomam à meiose após
89 sua retirada dos folículos.

90 O reinício da meiose caracteriza-se pela quebra da vesícula germinativa,
91 condensação da cromatina e formação do fuso da segunda divisão meiótica, seguindo pela
92 extrusão do primeiro corpúsculo polar e a progressão da prófase I para a metáfase da segunda
93 divisão meiótica (MII). Então, ocorre a segunda parada da meiose permanecendo até a
94 fecundação (EPPIG, 2001). Esse processo ocorre tanto *in vivo* como *in vitro*, porém muitos
95 oócitos maturados *in vitro* e que alcançam a metáfase II não possuem a mesma competência
96 para se desenvolver em comparação aos oócitos maturados *in vivo*, pois não sofrem
97 adequadamente o processo de capacitação (AVERY et al., 2002).

98 Acredita-se que a etapa de maturação seja crucial para que se tenha uma adequada
99 aquisição da competência oocitária. É neste estágio que os oócitos adquirem sua competência
100 para serem fecundados, mostrando sua capacidade máxima durante o desenvolvimento
101 embrionário inicial, até que ocorra a transição materno-zigótica pela ativação do genoma
102 embrionário. A maturação oocitária mostra-se essencial para produzir blastocistos de boa
103 qualidade (RUSSELL et al., 2006).

104 A maioria dos laboratórios utiliza como meio de maturação *in vitro* para oócitos
105 bovinos o Tissue Culture Medium (TCM). Existem poucos relatos sugerindo que outro meio
106 possa ser mais adequado (GONÇALVES et al., 2002). Este meio base geralmente é
107 suplementado com soro fetal bovino (SFB), aminoácidos como L-glutamina, bicarbonato de
108 sódio, FSH, LH, estradiol-17 β , piruvato de sódio, lactato, vitaminas e antibióticos
109 (LONERGAN et al., 1994). A maturação deve ser realizada em uma incubadora que
110 mantenha uma atmosfera gasosa e temperatura controlada e adequada, contendo 5% de CO₂
111 em ar e umidade saturada (GONÇALVES et al., 2007).

112 **2.2.2 Fertilização *in vitro***

113 A maioria dos laboratórios utiliza sêmen congelado para a etapa de fecundação *in*
114 *vitro*. Após o descongelamento é preciso selecionar os espermatozoides vivos e capacitá-los *in*
115 *vitro*. Esta seleção pode ser realizada por dois métodos diferentes: gradiente descontínuo
116 Percoll (GALLI;LAZZARI, 1996) e *swim-up* (PARRISH et al., 1995). O método de gradiente
117 descontínuo Percoll é o mais antigo e utilizado, onde o sêmen é depositado sobre duas
118 camadas de densidades diferentes (45% e 90%) e submetido a centrifugação (GARCÍA-
119 HERREROS; LEAL, 2014), proporcionando maior recuperação de espermatozoides móveis
120 com maior qualidade (SOMFAI et al., 2002), além de ser considerado rápido é um dos
121 métodos mais eficazes para remover o plasma seminal e diluentes crioprotetores (LEE et al.,
122 2009). Já o método *Swim-up* consiste na separação dos espermatozoides através da natação,
123 proporcionando taxas de recuperação menores de espermatozoides móveis, devido às muitas
124 camadas de sêmen nos níveis mais baixos do sedimento que podem bloquear as possibilidades
125 de alcançar o meio (CESARI et al., 2009).

126 Segundo alguns autores, o meio mais utilizado para a fecundação *in vitro* é o Fert-
127 TALP (Tyrode-albumina-lactato-piruvato), o qual contém agentes que promovem a
128 capacitação espermática, como a heparina. Já o meio Sperm-TALP é uma solução eletrolítica
129 e frequentemente usada como um meio para induzir a capacitação dos espermatozoides
130 (BURANAAMNUAY 2013). Há outros fatores significativos para a motilidade progressiva e

131 suporte do gameta masculino como a epinefrina, hipotaurina e penicilamina. O tempo de co-
132 incubação dos oócitos e espermatozoides pode variar por um período de 18 a 22 horas, em
133 temperatura de 39 °C e atmosfera com 5% de CO₂ em ar e umidade saturada. Para isso, os
134 espermatozoides são acrescentados nas gotas de meio de fecundação contendo os oócitos
135 maduros. A dose inseminante possui uma concentração final que pode variar de 1 a 5x10⁶
136 espermatozoides vivos/mL (IRITANI;NIWA, 1977).

2.2.3 Cultivo *in vitro*

137 Após a fecundação os prováveis zigotos são transferidos para o cultivo embrionário.
138 São utilizados nessa fase os meios semi-definidos como CR-1, CR-2, KSOM e *Synthetic*
139 *Oviductal Fluid* (SOF), meio de cultivo celular 199 (TCM-199) e meio Ham's F-10 TCM 199.

140 O meio mais utilizado nos laboratórios é o SOF, suplementado com proteínas,
141 substâncias energéticas, aminoácidos essenciais e não essenciais. Em geral, os meios
142 utilizados para o cultivo embrionário são suplementados com uma fonte proteica tal como
143 soro fetal bovino, soro sintético quimicamente definido, e albumina sérica bovina (HOLM et
144 al., 1999).

145 Os prováveis zigotos permanecem em ambiente controlado por sete dias, ou até
146 atingirem o estágio de blastocisto, período em que estão aptos a serem transferidos para
147 receptoras, ou serem criopreservados em temperatura de 38,8 °C com atmosfera controlada
148 em baixa tensão de oxigênio (5% de O₂, 5% de CO₂ e 90% de N₂) ou alta tensão de oxigênio
149 (5% de CO₂, em ar (20% de O₂)), e umidade saturada (HOLM et al., 1999).

2.3 Diferenças entre embriões produzidos *in vitro* e produzidos *in vivo*

150 Os embriões PIV apresentam características morfológicas e moleculares diferentes
151 dos embriões produzidos *in vivo* (WRIGHT JR;ELLINGTON, 1995). Embriões produzidos *in*
152 *vitro* apresentam desenvolvimento mais acelerado, diâmetro menor a partir da fase de
153 blastocisto e geralmente anormalidades mitocondriais (CROSIER et al., 2001) como cristas
154 periféricas e formato circular (FAIR et al., 1997), redução na quantidade de microvilosidades
155 que recobrem a membrana plasmática e das junções GAP, diminuindo o contato entre as
156 células do trofoblasto (FAIR et al., 2001), além de apresentarem diferenças metabólicas
157 (THOMPSON, 2000).

158 O excessivo acúmulo lipídico citoplasmático é conhecido e é considerado um motivo
159 relevante para justificar a menor criotolerância e conseqüentemente à baixa sobrevivência
160 após a descongelação. Já foi descrito que maior conteúdo lipídico é observado quando o soro

161 fetal bovino (SFB) é utilizado como fonte proteica durante o cultivo de desenvolvimento
162 embrionário (MUCCI et al., 2006).

2.4 Espécies reativas de oxigênio, sua relação com o estresse oxidativo e seus efeitos na produção *in vitro* de embriões bovinos

163 O estresse oxidativo é definido como o resultado do desequilíbrio entre a produção
164 de ROS e os mecanismos celulares antioxidantes (FEUGANG et al., 2003). O estresse
165 oxidativo promove peroxidação lipídica, oxidação dos aminoácidos e ácidos nucleicos,
166 acarretando na morte celular. Em sistema de PIV a concentração de ROS é maior (GOTO et
167 al., 1993) podendo ser relacionada com o bloqueio do desenvolvimento embrionário (GOTO
168 et al., 1992) e com a diminuição da eficiência da qualidade e da produção de embriões
169 (FEUGANG et al., 2003).

170 As ROS formam-se durante as etapas intermediárias da redução da molécula de
171 oxigênio, que inclui o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical
172 hidroxila (OH^{\cdot}), correspondendo à redução de um, dois e três elétrons. A ativação da molécula
173 de oxigênio é catalisada por complexos metálicos ou por pequenas moléculas (xenobióticos).
174 Além do mais, o radical hidroperóxido (HO_2^{\cdot}), um ácido conjugado do radical superóxido,
175 desempenha um papel importante na ativação da cascata de peroxidação lipídica nas
176 membranas celulares (GUERIN et al., 2001).

177 Já foi demonstrado que as ROS exercem efeitos benéficos na interação entre os
178 gametas e malefícios na motilidade espermática. A presença de ROS durante a fertilização é
179 necessária para otimizar a interação do oócito com o espermatozoide (WOLF, 2005),
180 estando envolvidas em diversos processos relacionados com a fisiologia ovariana e
181 gametogênese, incluindo a maturação oocitária, esteroidogênese e função do corpo lúteo
182 (BEHRMAN et al., 2001; ISHIKAWA, 1993).

183 A presença de ROS em grandes quantidades acarreta em diferentes tipos de injúrias
184 celulares, tais como peroxidação lipídica (fosfolipídeos de membrana), oxidação de
185 aminoácidos e ácidos nucleicos, necrose e apoptose que podem levar a diminuição da
186 viabilidade da PIVE (ALI et al., 2003; HALLIWELL et al., 1992). As ROS também têm sido
187 relacionadas com o bloqueio do desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro*, e os efeitos
188 deletérios na maturação oocitária podem ter alterações na qualidade embrionária (GUERIN et
189 al., 2001).

190 Vários são os fatores exógenos que podem alterar a produção de ROS nos sistemas
191 de PIV, como: elevada tensão de oxigênio durante o cultivo, presença de cátions metálicos na

192 água e/ou reagentes utilizados, exposição à luz visível, produção de ROS pelos
193 espermatozoides durante a fertilização, excesso de glicose e o processo de
194 criopreservação/reaquecimento (GUERIN et al., 2001).

195 Guerin et al., (2001) relataram que houve aumento da quantidade de ROS em
196 embriões de ratos e bovinos na CIV sob elevada tensão de oxigênio (20%). Quando
197 cultivados sob baixa tensão de oxigênio (5-7%) houve uma menor quantidade de ROS e
198 consequentemente uma melhor taxa de desenvolvimento embrionário em ambas as espécies.

199 O sistema reprodutivo da fêmea é naturalmente rico em antioxidantes, e possui
200 diferenças consideráveis do meio sintético usado para a PIV (CARBONE et al., 2003). Os
201 meios de PIV possuem pequenas quantidades de antioxidantes e apresentam altas
202 concentrações de ROS, tornando necessário adicionar antioxidantes aos meios de cultura.
203 Uma ampla variedade de antioxidantes vem sendo usados para reduzir a quantidade de ROS
204 durante a produção *in vitro*, mas, ainda não está claro qual antioxidante é o mais eficiente para
205 o desenvolvimento e a qualidade dos embriões bovinos (SOVERNIGO et al., 2017).

2.5 Antioxidantes

206 Os antioxidantes são classificados em hidrofílicos (solúvel em água) e hidrofóbicos
207 (não solúveis). Simplificando, os antioxidantes solúveis em água reagem como oxidantes no
208 citoplasma, enquanto antioxidantes solúveis em lipídeos agem protegendo as membranas de
209 peroxidação lipídica (SIES, 1999).

210 Alguns antioxidantes já foram adicionados aos meios de cultivos e ou de oócitos e
211 embriões, com o objetivo de diminuir a produção de radicais livres. Como exemplo, podemos
212 citar a vitamina E (α -tocoferol) sendo uma substância lipossolúvel, podendo ser conhecida
213 como inibidora da peroxidação lipídica predominante na membrana plasmática, onde,
214 quantidades significativas desta vitamina estão presentes no ovário e no fluido folicular
215 (BREININGER et al., 2005).

216 Antioxidantes como o trolox (análogo sintético da vitamina E) (FEUGANG et al.,
217 2004), a catalase (PAUDEL et al., 2010) e o β -mercaptoetanol (β ME) (HOSSEINI et al.,
218 2009) foram adicionados ao meio de cultivo e/ou criopreservação de embriões, para diminuir
219 os radicais livres. Porém, o efeito benéfico dessas substâncias antes e após a criopreservação
220 ainda deve ser melhor estudado (DODE et al., 2013)

221 Entre os compostos mais utilizados o β ME, um tiol de baixo peso molecular, tem
222 sido frequentemente utilizado por aumentar a capacidade antioxidante dos embriões, pois
223 reduz os níveis intracelulares de ROS. Após a criopreservação, embriões tratados com β ME

224 mostraram ser menos susceptíveis aos efeitos deletérios dos ROS (LANE et al., 2002;
225 MARTINEZ et al., 2002).

226 Outro agente antioxidante é o resveratrol (R; 3,4', 5- triidroxiestilbeno), uma
227 molécula polifenólica natural, encontrada em várias plantas e alimentos (BAUR;SINCLAIR,
228 2006). Estudos vêm sendo realizados para descobrir quais são as funções biológicas e
229 atividades do resveratrol para a reprodução de mamíferos (HUANG et al., 2013; KWAK et
230 al., 2012). A suplementação do meio de MIV com resveratrol melhorou os resultados de
231 fecundação, além do desenvolvimento embrionário em bovinos (SUGIYAMA et al., 2015) e
232 suínos (ITAMI et al., 2015). Foi observado um aumento nos níveis de glutathione (GSH) em
233 oócitos suínos (KWAK et al., 2012) e bovinos (WANG et al., 2014), com isso, houve
234 menores níveis de ROS, sem o comprometimento do desenvolvimento embrionário
235 (SALZANO et al., 2014). Ademais, em suínos quando os meios de vitrificação foram
236 suplementados com resveratrol, os níveis apoptóticos diminuíram (GIARETTA et al., 2013).

237 A **catalase é um antioxidante enzimático**, conhecido como antioxidante natural,
238 neutralizando o excesso das ROS e prevenindo danos da estrutura celular (ANDRADE et al.,
239 2010).

240 A L-carnitina é um nutriente sintetizado a partir da lisina, um aminoácido essencial
241 presente em todas as mitocôndrias do corpo. Estudos demonstram o seu uso durante o
242 desenvolvimento *in vitro* e na maturação oocitária, aumentando o desenvolvimento
243 embrionário e a massa celular interna (DUNNING et al., 2001), possuindo atividade
244 antioxidante, protegendo as membranas mitocondriais e o DNA contra o dano induzido por
245 ROS, aumentando também a concentração de glutathione (WU et al., 2011; SOMFAI et al.,
246 2011).

2.6 L-carnitina

247 Além de sua função delipidante, a L-carnitina possui efeito antioxidante (GÜLÇIN,
248 2006), reduzindo o acúmulo das ROS e diminuindo a frequência de apoptose em células
249 animais (PILLICH et al., 2005; YE et al., 2010). A ação de mecanismo da L-carnitina pode
250 ser pelo sequestro de radicais livres (TAKAHASHI et al., 2013) via 1,1-difenil- 2-picril-
251 hidrazil (DPPH), eliminação dos radicais de ânions superóxido, eliminação do peróxido de
252 hidrogênio, potência redutora total e quelante de metais de íons ferrosos (GÜLÇIN, 2006).

253 Seu efeito foi observado em oócitos e embriões suínos (SOMFAI, TAMÁS et al.,
254 2011; WU et al., 2011) e em embriões bovinos, onde a elevada produção das ROS ocasionada
255 pelo metabolismo de lipídios foi controlada pela L-carnitina (TAKAHASHI et al., 2013).

256 A adição de L-carnitina durante a MIV reduz as ROS e aumenta as concentrações de
257 GSH em oócitos de suínos (WU et al., 2011), melhorando também a competência meiótica e
258 da maturação citoplasmática (ZARE et al., 2015). Quando adicionado na CIV inibe também o
259 excesso de ROS e reduz a incidência de apoptose em embriões suínos partenogênicos (WU et
260 al., 2011) e embriões clones (YOU et al., 2012).

261 Os efeitos da L-carnitina podem diminuir as gotas lipídicas em torno de mitocôndrias
262 e/ou melhorar o metabolismo energético necessário para a sobrevivência celular sob estresse
263 oxidativo (CHANG et al., 2005; MIYAMOTO et al., 2010). Durante o desenvolvimento
264 embrionário, o dano causado pelo estresse oxidativo pode diminuir ao adicionar antioxidantes
265 aos meios de cultura (TRUONG et al., 2016).

266 Pesquisas vem demonstrando a correlação que existe entre a qualidade dos oócitos e
267 de embriões cultivados *in vitro* com a capacidade de metabolização dos ácidos graxos
268 acumulados. A síntese de ATP é importante para que haja a metabolização dos ácidos graxos,
269 pois suportam as necessidades energéticas durante os processos de crescimento, meiose,
270 fertilização e embriogênese (NAGANO et al., 2006; STOJKOVIC et al., 2001). Os ácidos
271 graxos são armazenados nas células como gotículas de triglicerídios cercados por lipídios. Para
272 que se tenha a produção de ATP, os triglicerídios precisam ser catabolizados por lipólise. A
273 enzima lipase atua clivando os ácidos graxos em glicerol, os quais sofrem a metabolização nas
274 mitocôndrias através de β -oxidação (DUNNING;ROBKER, 2012)

275 A L-carnitina é quem regula a entrada dos ácidos graxos, na forma de acil graxo-coA na
276 mitocôndria. Dessa forma, a carnitina-acil-transferase I faz a primeira passagem do acil graxo
277 para o espaço intermembrana da mitocôndria, e a carnitina-acil-transferase II faz a passagem do
278 acil graxo para a matriz mitocondrial (DUNNING;ROBKER, 2012; SUTTON-MCDOWALL et
279 al., 2012).

280 Dunning et al. (2010), demonstraram o aumento da competência oocitária, observada
281 pelo aumento no desenvolvimento de blastocistos e do número de células da massa celular
282 interna, o que foi mediada pelo aumento na expressão do gene CPT1B nos complexos
283 cumulus-oócitos de camundongos durante a maturação. Acredita-se que este gene é limitante
284 para a taxa de β -oxidação e requer a L-carnitina como co-fator (SUTTON-MCDOWALL et
285 al., 2012).

286 Quando se tem a adição da L-carnitina ao meio, apresenta melhoras na competência
287 do oócito maturados *in vitro* e aumenta a quantidade do mesmo que progridem para o estágio
288 de Metáfase II em bovinos (PHONGNIMITR et al., 2013) e em suínos (SOMFAI, T. et al.,
289 2011; WU et al., 2011).

2.7 Tensão de oxigênio da incubadora

290 Já foi demonstrado que a atmosfera gasosa tem influenciado na produção e na
291 qualidade de embriões. A alta tensão de oxigênio provoca estresse oxidativo em diferentes
292 células de mamíferos, inclusive em embriões (BAVISTER, 1995; GUERIN et al., 2001).

293 A concentração de oxigênio influencia o desenvolvimento embrionário, prevenindo a
294 formação de radicais livres, que pode levar a peroxidação dos lipídios, acarretando danos
295 celulares tanto em embriões de murinos (NASR-ESFAHANI;JOHNSON, 1991) quanto em
296 bovinos (NAGAO et al., 2008). A baixa tensão de O₂ leva à redução da produção de ROS,
297 induzindo a apoptose, e permite que a atividade metabólica esteja mais próxima dos embriões
298 produzidos *in vivo* (CORRÊA et al., 2008). Consequentemente, o cultivo de embriões *in vitro*
299 em alta tensão de O₂ (20%) produz mais radicais livres quando comparados com embriões
300 cultivados em baixa tensão de O₂ (FUJITANI et al., 1997; TAKAHASHI et al., 2000).

2.8 Óxido Nítrico

301 O óxido nítrico (NO) é um componente resultante de reações metabólicas e
302 considerado como um radical livre. Ele é um gás, uma molécula pequena e hidrofóbica, que
303 passa facilmente através de membranas (KIECHLE;ZHANG, 2002). É sintetizado via
304 oxidação da L-arginina em **NO e L-citrulina (MONCADA et al., 1991), catalisada por**
305 **três diferentes isoformas de NOS (NO sintase)**, óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS),
306 óxido nítrico sintetase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintetase indutora (iNOS), os quais
307 são expressos em vários tecidos (VIÑAS et al., 2006).

308 A produção fisiológica do óxido nítrico é difícil de se definir, entretanto, quando seus
309 níveis estão altos podem provocar efeitos tóxicos, já que é um radical livre. Esta molécula
310 exerce um *feedback* negativo sobre si mesmo, inibindo as enzimas de NOS (MITCHELL et
311 al., 2004), possuindo um papel duplo como mediador ou supressor na morte celular
312 (KIECHLE;ZHANG, 2002).

313 Está envolvido em vários processos reprodutivos nas fêmeas, como a ovulação,
314 implantação e contração uterina, também é um mensageiro bioquímico com diversas ações
315 nos sistemas fisiológicos (MAUL et al., 2003). Pode prevenir a apoptose em vários tipos
316 celulares, como em células endoteliais (DIMMELER et al., 1997) e folículos ovarianos
317 (CHUN et al., 1995). A inibição da apoptose pelo óxido nítrico envolve a regulação de
318 sistemas antioxidantes intracelulares, além da inibição de enzimas pró-apoptóticas, por
319 exemplo a caspases (KIECHLE;ZHANG, 2002).

320 No embrião, o óxido nítrico altera a sinalização embrionária e inicia a hidroxilação e
321 nitração das proteínas embrionárias e do DNA, podendo afetar diretamente o
322 desenvolvimento embrionário (MAUL et al., 2003). Estudos mostram que o óxido nítrico
323 pode levar à morte celular por conta da sua alta reatividade com o ânion superóxido,
324 aumentando a produção de peroxinitrito, um oxidante altamente tóxico que danifica as células
325 (HSIEH et al., 2006).

326

327 **3 OBJETIVOS**

3.1 Objetivo Geral

328 Esse experimento teve como objetivo avaliar a suplementação de L-carnitina no meio
329 de cultivo embrionário sobre a qualidade dos embriões bovinos produzidos *in vitro* em
330 diferentes tensões de oxigênio durante o cultivo.

331

3.2 Objetivos Específicos

- 332 1- Avaliar a taxa de blastocistos obtida a partir do cultivo *in vitro* de embriões bovinos
333 suplementados com 3,03 mM de L-carnitina no cultivo em alta e baixa tensão de
334 oxigênio;
- 335 2- Avaliar a concentração de óxido nítrico em meio de cultivo suplementado com L-
336 carnitina em alta e baixa tensão de oxigênio;

3.1 REFERENCIA BIBLIOGRAFICA:

ALI, A.; BILODEAU, J.; SIRARD, M. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during in vitro maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v. 59, n. 3-4, p. 939-949, 2003. ISSN 0093-691X.

ANDRADE, E.; MELO-STERZA, F.; SENEDA, M.; ALFIERI, A. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79-85, 2010.

ASSUMPÇÃO, M. E. O. D. A.; HAIPECK, K.; DE LIMA, A. S.; DE MELLO, M. R. B.; DE OLIVEIRA, L. J.; DE OLIVEIRA, V. P.; TAVARES, L. M. T.; VISINTIN, J. A. Capacitação espermática in vitro com heparina e cálcio ionóforo e sua correlação com a fertilidade em touros. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 39, n. 3, p. 149-156, 2002. ISSN 1678-4456.

AVERY, B.; FÆRGE, I.; HOLM, P. Confocal microscopy of bovine OPU oocytes and of Roscovitine treated abattoir oocytes with emphasis on mitochondria distribution and nuclear stage. International Embryo Transfer Society, 2002.

BAUR, J. A.; SINCLAIR, D. A. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. **Nature reviews Drug discovery**, v. 5, n. 6, p. 493, 2006. ISSN 1474-1784.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human reproduction update**, v. 1, n. 2, p. 91-148, 1995. ISSN 1460-2369.

BEHRMAN, H. R.; KODAMAN, P. H.; PRESTON, S. L.; GAO, S. Oxidative stress and the ovary. **Journal of the Society for Gynecologic Investigation**, v. 8, n. 1_suppl, p. S40-S42, 2001. ISSN 1071-5576.

BILODEAU-GOESEELS, S. Effects of culture media and energy sources on the inhibition of nuclear maturation in bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 66, n. 2, p. 297-306, 2006.

BLONDIN, P. Status da produção de embriões no mundo. **In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões**, p. 33-35, 2015.

BO, G.; MAPLETOFT, R. Evaluation and classification of bovine embryos. **Anim Reprod**, v. 10, n. 3, p. 344-348, 2013.

BREININGER, E.; BEORLEGUI, N. B.; O'FLAHERTY, C. M.; BECONI, M. T. Alpha-tocopherol improves biochemical and dynamic parameters in cryopreserved boar semen. **Theriogenology**, v. 63, n. 8, p. 2126-2135, 2005. ISSN 0093-691X.

BURANAAMNUAY, Kakanang. Sperm-TALP: An Alternative Extender for Retrieving and Diluting Epididymal Sperm in the Domestic Cat. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 6, p. 912-917, 2013.

CARBONE, M.; TATONE, C.; MONACHE, S. D.; MARCI, R.; CASERTA, D.; COLONNA, R.; AMICARELLI, F. Antioxidant enzymatic defences in human follicular fluid: characterization and age-dependent changes. **MHR: Basic science of reproductive medicine**, v. 9, n. 11, p. 639-643, 2003. ISSN 1360-9947.

CESARI, A.; KAISER, G. G.; MUCCI, N.; MUTTO, A.; VINCENTI, A.; FORNÉS, M.; ALBERIO, R. H. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. **Theriogenology**, v. 66, n. 5, p. 1185-1193, 2006.

CHANG, B.; NISHIKAWA, M.; NISHIGUCHI, S.; INOUE, M. L-carnitine inhibits hepatocarcinogenesis via protection of mitochondria. **International journal of cancer**, v. 113, n. 5, p. 719-729, 2005. ISSN 0020-7136.

CHARPIGNY, G.; GUESNET, P.; MARQUANT-LEGUIENE, B.; HEYMAN, Y.; MERMILLOD, P.; HUMBLLOT, P. Fatty acid composition of triglycerides, phosphatidylcholines and phosphatidylethanolamines of bovine embryos. **BRG**, v. 4, p. 159-172, 2003.

CHAVES, R.; DUARTE, A.; MATOS, M.; FIGUEIREDO, J. Sistemas de cultivo in vitro para o desenvolvimento de oócitos imaturos de mamíferos. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 34, p. 37-49, 2010.

CHUN, S.-Y.; EISENHAEUER, K.; KUBO, M.; HSUEH, A. Interleukin-1 beta suppresses apoptosis in rat ovarian follicles by increasing nitric oxide production. **Endocrinology**, v. 136, n. 7, p. 3120-3127, 1995. ISSN 0013-7227.

CORRÊA, G. A.; RUMPF, R.; MUNDIM, T. C. D.; FRANCO, M. M.; DODE, M. A. N. Oxygen tension during in vitro culture of bovine embryos: effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Anim Reprod Sci**, v. 104, n. 2-4, p. 132-142, 2008. ISSN 0378-4320.

CROSIER, A. E.; FARIN, P. W.; DYKSTRA, M. J.; ALEXANDER, J. E.; FARIN, C. E. Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced in vivo or in vitro. **Biol Reprod**, v. 64, n. 5, p. 1375-1385, 2001. ISSN 0006-3363.

CUELLO, C.; GOMIS, J.; ALMIÑANA, C.; MASIDE, C.; SANCHEZ-OSORIO, J.; GIL, M.; SÁNCHEZ, A.; PARRILLA, I.; VAZQUEZ, J.; ROCA, J. Effect of MEM vitamins and forskolin on embryo development and vitrification tolerance of in vitro-produced pig embryos. **Anim Reprod Sci**, v. 136, n. 4, p. 296-302, 2013. ISSN 0378-4320.

DE LA TORRE-SANCHEZ, J. F.; PREIS, K.; SEIDEL, G. E. Metabolic regulation of in-vitro-produced bovine embryos. I. Effects of metabolic regulators at different glucose concentrations with embryos produced by semen from different bulls. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, n. 5, p. 585-596, 2006. ISSN 1448-5990.

DE LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A.; KODAMA, H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of reproduction**, v. 2, n. 1, p. 48-54, 1997. ISSN 1470-1626.

DIMMELER, S.; HAENDELER, J.; NEHLS, M.; ZEIHNER, A. M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ice)-like and cysteine protease protein (cpe)-32-like proteases. **Journal of Experimental Medicine**, v. 185, n. 4, p. 601-608, 1997. ISSN 0022-1007.

DODE, M.; LEME, L.; SPRÍCIGO, J. Criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro. **Rev. bras. reprod. anim**, v. 37, n. 2, p. 145-150, 2013. ISSN 0102-0803.

DUNNING, K. R.; CASHMAN, K.; RUSSELL, D. L.; THOMPSON, J. G.; NORMAN, R. J.; ROBKER, R. L. Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. **Biol Reprod**, v. 83, n. 6, p. 909-918, 2010.

DUNNING, K.R.; AKISON, L.K.; RUSSEL, D.L.; NORMAN, R.J.; ROBKER, R.L. Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental competence in response to L-carnitine during ovarian in vitro follicle development in mice. **Biology Reproduction**. v.85, p. 548-555. 2011.

DUNNING, K. R.; ROBKER, R. L. Promoting lipid utilization with l-carnitine to improve oocyte quality. **Anim Reprod Sci**, v. 134, n. 1-2, p. 69-75, 2012.

EDIDIN, M. Lipids on the frontier: a century of cell-membrane bilayers. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 414, 2003. ISSN 1471-0080.

EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. **Reproduction**, v. 122, n. 6, p. 829-838, 2001. ISSN 1470-1626.

FAIR, T.; HYTTEL, P.; GREVE, T.; BOLAND, M. Cytoplasmic ultrastructure of growing and fully grown bovine oocytes. **Anat and Embryol**, v. 195, p. 327-336, 1997.

FAIR, T.; LONERGAN, P.; DINNYES, A.; COTTELL, D.; HYTTEL, P.; WARD, F.; BOLAND, M. Ultrastructure of bovine blastocysts following cryopreservation: effect of method of blastocyst production. **Mol Reprod Dev**, v. 58, n. 2, p. 186-195, 2001.

FERGUSON, E. M.; LEESE, H. J. A potential role for triglyceride as an energy source during bovine oocyte maturation and early embryo development. **Mol Reprod Dev**, v. 73, n. 9, p. 1195-1201, 2006.

FEUGANG, J.-M.; DE ROOVER, R.; MOENS, A.; LÉONARD, S.; DESSY, F.; DONNAY, I. Addition of β -mercaptoethanol or Trolox® at the morula/blastocyst stage improves the quality of bovine blastocysts and prevents induction of apoptosis and degeneration by prooxidant agents. **Theriogenology**, v. 61, n. 1, p. 71-90, 2004.

FEUGANG, J.-M.; VAN LANGENDONCKT, A.; SAYOUD, H.; REES, J.-F.; PAMPFER, S.; MOENS, A.; DESSY, F.; DONNAY, I. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. **Zygote**, v. 11, n. 2, p. 107-118, 2003.

FUJITANI, Y.; KASAI, K.; OHTANI, S.; NISHIMURA, K.; YAMADA, M.; UTSUMI, K. Effect of oxygen concentration and free radicals on in vitro development of in vitro-produced bovine embryos. **Journal of animal science**, v. 75, n. 2, p. 483-489, 1997.

GALLI, C.; LAZZARI, G. Practical aspects of IVM/IVF in cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 42, n. 1-4, p. 371-379, 1996. ISSN 0378-4320.

GARCÍA-HERREROS, M.; LEAL, C. L. V. Comparative study of sperm washing and selection methods after cryopreservation and its influence on sperm subpopulational structure in a bovine model. **Systems biology in reproductive medicine**, v. 60, n. 6, p. 338-347, 2014.

GHANEM, N.; HA, A.-N.; FAKRUZZAMAN, M.; BANG, J.-I.; LEE, S.-C.; KONG, I.-K. Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced in vitro and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. **Theriogenology**, v. 82, n. 2, p. 238-250, 2014. ISSN 0093-691X.

GIARETTA, E.; SPINACI, M.; BUCCI, D.; TAMANINI, C.; GALEATI, G. Effects of resveratrol on vitrified porcine oocytes. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2013, 2013. ISSN 1942-0900.

GOMIS, J.; CUELLO, C.; SANCHEZ-OSORIO, J.; GIL, M.; PARRILLA, I.; ANGEL, M.; VAZQUEZ, J.; ROCA, J.; MARTINEZ, E. Forskolin improves the cryosurvival of in vivo-derived porcine embryos at very early stages using two vitrification methods. **Cryobiology**, v. 66, n. 2, p. 144-150, 2013. ISSN 0011-2240.

GONÇALVES, P.; BARRETA, M.; SANDRI, L.; FERREIRA, R.; ANTONIAZZI, A. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 2, p. 212-217, 2007.

GONÇALVES, P.; FIGUEIREDO, J.; FREITAS, V. Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal-2ª Edição. **Roca**, 2002.

GOTO, Y.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reactive oxygen species in embryos cultured in vitro. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 15, n. 1, p. 69-75, 1993. ISSN 0891-5849.

GOTO, Y.; NODA, Y.; NARIMOTO, K.; UMAOKA, Y.; MORI, T. Oxidative stress on mouse embryo development in vitro. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 47-53, 1992. ISSN 0891-5849.

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

GÜLÇİN, İ. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life sciences**, v. 78, n. 8, p. 803-811, 2006. ISSN 0024-3205.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução animal**: São Paulo: Manole 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 119, n. 6, p. 598-620, 1992. ISSN 0022-2143.

HOSSEINI, S.; FOROUZANFAR, M.; HAJIAN, M.; ASGARI, V.; ABEDI, P.; HOSSEINI, L.; OSTADHOSSEINI, S.; MOULAVI, F.; LANGRROODI, M. S.; SADEGHI, H. Antioxidant supplementation of culture medium during embryo development and/or after vitrification-warming; which is the most important? **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 26, n. 6, p. 355-364, 2009.

HSIEH, T.-J.; LIU, T.-Z.; LU, F.-J.; HSIEH, P.-Y.; CHEN, C.-H. Actinodaphnine induces apoptosis through increased nitric oxide, reactive oxygen species and down-regulation of NF- κ B signaling in human hepatoma Mahlavu cells. **Food and chemical toxicology**, v. 44, n. 3, p. 344-354, 2006. ISSN 0278-6915.

HUANG, W.; LI, G.; QIU, J.; GONZALEZ, P.; CHALLA, P. Protective effects of resveratrol in experimental retinal detachment. **PLoS one**, v. 8, n. 9, p. e75735, 2013.

IRITANI, A.; NIWA, K. Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. **Journal of reproduction and fertility**, v. 50, n. 1, p. 119-121, 1977. ISSN 1470-1626.

ISHIKAWA, M. Oxygen radicals-superoxide dismutase system and reproduction medicine. **Nihon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi**, v. 45, n. 8, p. 842-848, 1993.

ITAMI, N.; SHIRASUNA, K.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Resveratrol improves the quality of pig oocytes derived from early antral follicles through sirtuin 1 activation. **Theriogenology**, v. 83, n. 8, p. 1360-1367, 2015. ISSN 0093-691X.

KERE, M.; SIRIBOON, C.; LO, N.-W.; NGUYEN, N. T.; JU, J.-C. Ascorbic acid improves the developmental competence of porcine oocytes after parthenogenetic activation and somatic cell nuclear transplantation. **Journal of Reproduction and Development**, 2012. ISSN 0916-8818.

KIECHLE, F. L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, n. 1-2, p. 27-45, 2002. ISSN 0009-8981.

KNIJN, H. M.; GJØRRET, J. O.; VOS, P. L.; HENDRIKSEN, P. J.; VAN DER WEIJDEN, B. C.; MADDOX-HYTTEL, P.; DIELEMAN, S. J. Consequences of in vivo development and subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. **Biol Reprod**, v. 69, n. 4, p. 1371-1378, 2003.

HOLM P.; BOOTH P. J.; SCHIMIDT M. H.; GREVE T.; CALLESEN H. High bovine blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium supplemented with sodium citrate and myo-inositol with or without serum-proteins. **Theriogenology**. 1999;52:683-700.

KUERSCHNER, L.; MOESSINGER, C.; THIELE, C. Imaging of lipid biosynthesis: how a neutral lipid enters lipid droplets. **Traffic**, v. 9, n. 3, p. 338-352, 2008.

KWAK, S.-S.; CHEONG, S.-A.; JEON, Y.; LEE, E.; CHOI, K.-C.; JEUNG, E.-B.; HYUN, S.-H. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. **Theriogenology**, v. 78, n. 1, p. 86-101, 2012. ISSN 0093-691X.

LANE, M.; MAYBACH, J. M.; GARDNER, D. K. Addition of ascorbate during cryopreservation stimulates subsequent embryo development. **Hum Reprod**, v. 17, n. 10, p. 2686-2693, 2002. ISSN 1460-2350.

LEE, H.-L.; KIM, S.-H.; JI, D.-B.; KIM, Y.-J. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. **Journal of veterinary science**, v. 10, n. 3, p. 249-255, 2009.

LIM, J.; REGGIO, B.; GODKE, R.; HANSEL, W. Development of in-vitro-derived bovine embryos cultured in 5% CO₂ in air or in 5% O₂, 5% CO₂ and 90% N₂. **Hum Reprod**, v. 14, n. 2, p. 458-464, 1999. ISSN 1460-2350.

LONERGAN, P.; CAROLAN, C.; MERMILLOD, P. Development of bovine embryos in vitro following oocyte maturation under defined conditions. **Reproduction Nutrition Development**, v. 34, n. 4, p. 329-339, 1994. ISSN 0926-5287.

LONERGAN, P.; GUTIERREZ-ADAN, A.; RIZOS, D.; PINTADO, B.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P. Relative messenger RNA abundance in bovine oocytes collected in vitro or in vivo before and 20 hr after the preovulatory luteinizing hormone surge. **Mol Reprod Dev**, v. 66, n. 3, p. 297-305, Nov 2003.

LONERGAN, P.; GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; PINTADO, B.; FAIR, T.; WARD, F.; FUENTE, J. D. L.; BOLAND, M. Relationship between time of first cleavage and the expression of IGF-I growth factor, its receptor, and two housekeeping genes in bovine two-cell embryos and blastocysts produced in vitro. **Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research**, v. 57, n. 2, p. 146-152, 2000.

MARCHESAN, D.; RUTBERG, M.; ANDERSSON, L.; ASP, L.; LARSSON, T.; BORÉN, J.; JOHANSSON, B. R.; OLOFSSON, S.-O. A phospholipase D-dependent process forms lipid droplets containing caveolin, adipocyte differentiation-related protein, and vimentin in a cell-free system. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 27293-27300, 2003. ISSN 0021-9258.

MARTINEZ, A.; BROGLIATTI, G.; VALCARCEL, A.; DE LAS HERAS, M. Pregnancy rates after transfer of frozen bovine embryos: a field trial. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 963-972, 2002. ISSN 0093-691X.

MAUL, H.; LONGO, M.; SAADE, G.; GARFIELD, R. Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. **Current pharmaceutical design**, v. 9, n. 5, p. 359-380, 2003. ISSN 1381-6128.

MELVIN, J.; REECE, W. Dukes-Fisiologia dos animais domésticos. **Dukes: Fisiologia dos animais domésticos**, 1996.

MEN, H.; AGCA, Y.; RILEY, L. K.; CRITSER, J. K. Improved survival of vitrified porcine embryos after partial delipitation through chemically stimulated lipolysis and inhibition of apoptosis. **Theriogenology**, v. 66, n. 8, p. 2008-2016, 2006.

MENEGHEL, M.; DALL'ACQUA, P. C.; AMBROGI, M.; LEÃO, B.; ROCHA-FRIGONI, N. A.; MINGOTI, G. Z. Lipid content and cryotolerance of in vitro-produced bovine embryos treated with forskolin before vitrification. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 395-400, 2017. ISSN 0100-736X.

MINGORANCE, C.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R.; JUSTO, M. L.; HERRERA, M. D.; DE SOTOMAYOR, M. A. Pharmacological effects and clinical applications of propionyl-L-carnitine. **Nutrition reviews**, v. 69, n. 5, p. 279-290, 2011. ISSN 1753-4887.

MITCHELL, L. M.; KENNEDY, C. R.; HARTSHORNE, G. M. Pharmacological manipulation of nitric oxide levels in mouse follicle cultures demonstrates key role of extrafollicular control of ovulation. **Hum Reprod**, v. 19, n. 8, p. 1705-1712, 2004. ISSN 1460-2350.

MIYAMOTO, K.; SATO, E. F.; KASAHARA, E.; JIKUMARU, M.; HIRAMOTO, K.; TABATA, H.; KATSURAGI, M.; ODO, S.; UTSUMI, K.; INOUE, M. Effect of oxidative stress during repeated ovulation on the structure and functions of the ovary, oocytes, and their mitochondria. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 4, p. 674-681, 2010. ISSN 0891-5849.

MONCADA, S., PALMER, R. M. J., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharm.** v. 43, p. 109-142, 1991

MUCCI, N.; ALLER, J.; KAISER, G. G.; HOZBOR, F.; CABODEVILA, J.; ALBERIO, R. H. Effect of estrous cow serum during bovine embryo culture on blastocyst development and cryotolerance after slow freezing or vitrification. **Theriogenology**, v. 65, n. 8, p. 1551-1562, 2006. ISSN 0093-691X.

NAGANO, M.; KATAGIRI, S.; TAKAHASHI, Y. ATP content and maturational/developmental ability of bovine oocytes with various cytoplasmic morphologies. **Zygote**, v. 14, n. 4, p. 299-304, 2006. ISSN 1469-8730.

NAGAO, Y.; IJIMA, R.; SAEKI, K. Interaction between embryos and culture conditions during in vitro development of bovine early embryos. **Zygote**, v. 16, n. 2, p. 127-133, 2008. ISSN 1469-8730.

NASR-ESFAHANI, M. M.; JOHNSON, M. H. The origin of reactive oxygen species in mouse embryos cultured in vitro. **Development**, v. 113, n. 2, p. 551-560, 1991.

NELSON, D. L.; COX, M. M. Lehniger princípios de bioquímica. **São Paulo: Sarvier**, v. 3, 2002.

PARK, B.; LEE, H.; LEE, Y.; ELAHI, F.; LEE, J.; LEE, S. T.; PARK, C.-K.; HYUN, S.-H.; LEE, E. Cilostamide and forskolin treatment during pre-IVM improves

preimplantation development of cloned embryos by influencing meiotic progression and gap junction communication in pigs. **Theriogenology**, v. 86, n. 3, p. 757-765, 2016.

PARRISH, J.; KROGENAES, A.; SUSKO-PARRISH, J. Effect of bovine sperm separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro fertilization and early embryonic development. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 859-869, 1995.

PASCHOAL, D. M.; SUDANO, M. J.; SCHWARZ, K. R. L.; MAZIERO, R. R. D.; GUASTALI, M. D.; CROCOMO, L. F.; MAGALHÃES, L. C. O.; MARTINS JR, A.; LEAL, C. L. V.; DA CRUZ LANDIM-ALVARENGA, F. Cell apoptosis and lipid content of in vitro-produced, vitrified bovine embryos treated with forskolin. **Theriogenology**, v. 87, p. 108-114, 2017. ISSN 0093-691X.

PAUDEL, K.; KUMAR, S.; MEUR, S.; KUMARESAN, A. Ascorbic Acid, Catalase and Chlorpromazine Reduce Cryopreservation-induced Damages to Crossbred Bull Spermatozoa a. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 45, n. 2, p. 256-262, 2010.

PEREIRA, R.; CARVALHAIS, I.; PIMENTA, J.; BAPTISTA, M.; VASQUES, M.; HORTA, A.; SANTOS, I.; MARQUES, M.; REIS, A.; PEREIRA, M. S. Biopsied and vitrified bovine embryos viability is improved by trans10, cis12 conjugated linoleic acid supplementation during in vitro embryo culture. **Anim Reprod Sci**, v. 106, n. 3-4, p. 322-332, 2008. ISSN 0378-4320.

PEREIRA, R. M.; BAPTISTA, M. C.; VASQUES, M. I.; HORTA, A. E.; PORTUGAL, P. V.; BESSA, R. J.; SILVA, J. C.; PEREIRA, M. S.; MARQUES, C. C. Cryosurvival of bovine blastocysts is enhanced by culture with trans-10 cis-12 conjugated linoleic acid (10t,12c CLA). **Anim Reprod Sci**, v. 98, n. 3-4, p. 293-301, 2007.

PHONGNIMITR, T.; LIANG, Y.; SRIRATTANA, K.; PANYAWAI, K.; SRIPUNYA, N.; TREETAMPINICH, C.; PARNPAI, R. Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. **Animal Science Journal**, v. 84, n. 11, p. 719-725, 2013. ISSN 1344-3941.

PILLICH, R. T.; SCARSELLA, G.; RISULEO, G. Reduction of apoptosis through the mitochondrial pathway by the administration of acetyl-L-carnitine to mouse fibroblasts in culture. **Experimental cell research**, v. 306, n. 1, p. 1-8, 2005. ISSN 0014-4827.

ROCHA-FRIGONI, N. A.; LEÃO, B. C.; DALL'ACQUA, P. C.; MINGOTI, G. Z. 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, 2016.

RUSSELL, D. F.; BAQIR, S.; BORDIGNON, J.; BETTS, D. H. The impact of oocyte maturation media on early bovine embryonic development. **Mol Reprod Dev**, v. 73, n. 10, p. 1255-1270, 2006.

SALZANO, A.; ALBERO, G.; ZULLO, G.; NEGLIA, G.; ABDEL-WAHAB, A.; BIFULCO, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. Effect of resveratrol supplementation during culture on the quality and cryotolerance of bovine in vitro produced embryos. **Anim Reprod Sci**, v. 151, n. 3-4, p. 91-96, 2014. ISSN 0378-4320.

SANCHES, B. V.; MARINHO, L. S.; FILHO, B. D.; PONTES, J. H.; BASSO, A. C.; MEIRINHOS, M. L.; SILVA-SANTOS, K. C.; FERREIRA, C. R.; SENEDA, M. M. Cryosurvival and pregnancy rates after exposure of IVF-derived *Bos indicus* embryos to forskolin before vitrification. **Theriogenology**, v. 80, n. 4, p. 372-377, Sep 1 2013.

SANTOS, J.; CERRI, R.; SARTORI, R. Nutritional management of the donor cow. **Theriogenology**, v. 69, n. 1, p. 88-97, 2008. ISSN 0093-691X.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, n. 9-10, p. 916-921, 1999. ISSN 0891-5849.

SOMFAI, T.; IMAI, K.; KANEDA, M.; AKAGI, S.; WATANABE, S.; HARAGUCHI, S.; MIZUTANI, E.; DANG-NGUYEN, T. Q.; INABA, Y.; GESHI, M.; NAGAI, T. The effect of ovary storage and in vitro maturation on mRNA levels in bovine oocytes; a possible impact of maternal ATP1A1 on blastocyst development in slaughterhouse-derived oocytes. **J Reprod Dev**, v. 57, n. 6, p. 723-730, 2011.

SOMFAI, T.; KANEDA, M.; AKAGI, S.; WATANABE, S.; HARAGUCHI, S.; MIZUTANI, E.; DANG-NGUYEN, T. Q.; GESHI, M.; KIKUCHI, K.; NAGAI, T. Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during in vitro maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, p. 912-920, 2011.

SOMFAI, T.; BODÓ, S.; NAGY, S.; PAPP, A.; IVANCSICS, J.; BARANYAI, B.; GOCZA, E.; KOVACS, A. Effect of swim up and Percoll treatment on viability and acrosome integrity of frozen-thawed bull spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 37, n. 5, p. 285-290, 2002.

SOVERNIGO, T.; ADONA, P.; MONZANI, P.; GUEMRA, S.; BARROS, F.; LOPES, F.; LEAL, C. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during in vitro maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 4, p. 561-569, 2017.

STOJKOVIC, M.; MACHADO, S. A.; STOJKOVIC, P.; ZAKHARTCHENKO, V.; HUTZLER, P.; GONÇALVES, P. B.; WOLF, E. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biol Reprod**, v. 64, n. 3, p. 904-909, 2001. ISSN 0006-3363.

SUDANO, M. J.; PASCHOAL, D. M.; RASCADO TDA, S.; MAGALHAES, L. C.; CROCOMO, L. F.; DE LIMA-NETO, J. F.; LANDIM-ALVARENGA FDA, C. Lipid content and apoptosis of in vitro-produced bovine embryos as determinants of susceptibility to vitrification. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1211-1220, 2011.

SUGIYAMA, M.; KAWAHARA-MIKI, R.; KAWANA, H.; SHIRASUNA, K.; KUWAYAMA, T.; IWATA, H. Resveratrol-induced mitochondrial synthesis and autophagy in oocytes derived from early antral follicles of aged cows. **Journal of Reproduction and Development**, v. 61, n. 4, p. 251-259, 2015. ISSN 0916-8818.

SUTTON-MCDOWALL, M. L.; FEIL, D.; ROBKER, R. L.; THOMPSON, J. G.; DUNNING, K. R. Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in bovine preimplantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, n. 8, p. 1632-1641, 2012.

TAKAHASHI, M.; KEICHO, K.; TAKAHASHI, H.; OGAWA, H.; SCHULTE, R.; OKANO, A. Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured bovine embryos by comet assay. **Theriogenology**, v. 54, n. 1, p. 137-145, 2000.

TAKAHASHI, T.; INABA, Y.; SOMFAI, T.; KANEDA, M.; GESHI, M.; NAGAI, T.; MANABE, N. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 25, n. 4, p. 589-599, 2013.

THOMPSON, J. In vitro culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos — a decade of achievement. **Anim Reprod Sci**, v. 60, p. 263-275, 2000. ISSN 0378-4320.

TRUONG, T. T.; SOH, Y. M.; GARDNER, D. K. Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. **Hum Reprod**, v. 31, n. 7, p. 1445-1454, 2016. ISSN 1460-2350.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.; MULLAART, E.; DE ROOS, A.; MERTON, J.; DEN DAAS, J.; KEMP, B.; DE RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 575-597, 2000. ISSN 0093-691X.

VIANA, J. H. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; SIQUEIRA, L. G. B. Brazilian embryo industry in context: pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia-Artigo em anais de congresso (ALICE)*, 2017, Animal Reproduction, v. 14, p. 476-481, 2017.

VIÑAS, J. L.; SOLA, A.; GENESCÀ, M.; ALFARO, V.; PÍ, F.; HOTTER, G. NO and NOS isoforms in the development of apoptosis in renal ischemia/reperfusion. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, n. 6, p. 992-1003, 2006. ISSN 0891-5849.

WANG, F.; TIAN, X.; ZHANG, L.; HE, C.; JI, P.; LI, Y.; TAN, D.; LIU, G. Beneficial effect of resveratrol on bovine oocyte maturation and subsequent embryonic development after in vitro fertilization. **Fertility and sterility**, v. 101, n. 2, p. 577-586. e571, 2014.

WATHES, D. C.; ABAYASEKARA, D. R. E.; AITKEN, R. J. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. **Biol Reprod**, v. 77, n. 2, p. 190-201, 2007.

WOLF, A. Estímulo da síntese da glutatona na maturação in vitro de oócitos bovinos e sua influência no desenvolvimento embrionário. 2005.

WRIGHT JR, R.; ELLINGTON, J. Morphological and physiological differences between in vivo-and in vitro-produced preimplantation embryos from livestock species. **Theriogenology**, v. 44, n. 8, p. 1167-1189, 1995.

WU, G.-Q.; JIA, B.-Y.; LI, J.-J.; FU, X.-W.; ZHOU, G.-B.; HOU, Y.-P.; ZHU, S.-E. L-carnitine enhances oocyte maturation and development of parthenogenetic embryos in pigs. **Theriogenology**, v. 76, p. 785-793, 2011.

YANG, X.; KUBOTA, C.; SUZUKI, H.; TANEJA, M.; BOLS, P.; PRESICCE, G. Control of oocyte maturation in cows—biological factors. **Theriogenology**, v. 49, n. 2, p. 471-482, 1998. ISSN 0093-691X.

YE, J.; LI, J.; YU, Y.; WEI, Q.; DENG, W.; YU, L. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. **Regulatory peptides**, v. 161, n. 1-3, p. 58-66, 2010. ISSN 0167-0115.

YOU, J.; LEE, J.; HYUN, S.-H.; LEE, E. L-carnitine treatment during oocyte maturation improves in vitro development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. **Theriogenology**, v. 78, p. 235-243, 2012.

ZARE, Z.; FARAHANI, R. M.; SALEHI, M.; PIRYAEI, A.; NOVIN, M. G.; FATHABADI, F. F.; MOHAMMADI, M.; DEGHANI-MOHAMMADABADI, M. Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 32, n. 4, p. 635-643, 2015. ISSN 1058-0468.

337 **CAPITULO 2*- Production of *in vitro* bovine embryos supplemented with L-**
338 **carnitine in different oxygen tensions and the relation to nitric oxide**

339

340 Daniela Moraes Pereira¹, Christopher Junior Tavares Cardoso², Wilian Aparecido Leite
341 da Silva³, Mirela Brochado Souza-Cáceres⁴, Mariana Santos¹, Ralf Pöhland⁴, Alan
342 Motta Couto¹, Iluska Senna Bonfá Moslaves⁶, Mônica Cristina Toffoli Kadri⁶, Fabiana
343 de Andrade Melo-Sterza*^{1,2, 5}

344

345 ¹State University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Aquidauana, Mato Grosso
346 do Sul, Brazil.

347 ²Federal University of Mato Grosso do Sul, Veterinary Science, Campo Grande, Mato
348 Grosso do Sul, Brazil

349 ³Federal University of Mato Grosso do Sul, Animal Science, Campo Grande, Mato
350 Grosso do Sul, Brazil

351 ⁴State University of Londrina, Animal Science, Londrina, Paraná, Brazil

352 ⁵Leibniz Institute for Farm Animal Biology, Institute of Reproductive Biology,
353 Dummerstorf, Germany.

354 ⁶Federal University of Mato Grosso do Sul, Pharmacology and Inflammation
355 Laboratory, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

356

357 *Corresponding author: Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul –
358 Aquidauana/MS. 25 Rodovia Graziela Maciel Barrozo, Km 12 Zona Rural, Aquidauana
359 – MS, CEP: 79200-000. Telefon: +55 67 39042242 E-mail: fabiana.sterza@uems.br

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379 **Abstract**

380 The aim of this study was to evaluate the production of bovine embryos *in vitro*
381 when supplemented with L-carnitine for 24 h beginning on day 5 (d 5) under 2 different
382 oxygen tensions (20% or 5%) and the relationship of nitric oxide (NO) in the IVC
383 medium with embryo development. The Cumulus-Oocyte-Complexes (COC; n = 837)
384 were matured *in vitro* for 24 hours and fertilization was performed for 18 hours. The
385 zygotes were cultured *in vitro* for 9 days after IVF in SOF medium with 5% Fetal Calf
386 Serum (FCS). At d5 the plates were assigned to 1 of 4 treatment groups: high (20%) or
387 low (5%) O₂ tension either with or without the addition of 3.03 mM L-carnitine (High-
388 Contr, High-Lcar, Low-Contr, Low-Lcar). On d 5, 6 and 9 the concentration of NO in
389 the culture medium was evaluated. A part of the embryos was submitted to evaluation
390 of intracellular lipid droplets on d 7. The cleavage rate was similar ($P > 0.05$) between
391 high and low O₂ tension and the blastocyst rate was similar in all conditions evaluated.
392 The hatching rate was higher ($P < 0.05$) for Low-Contr and the NO concentration for
393 Low-Contr was higher at d 9 ($P < 0.05$). The addition of 3.03 mM L-carnitine between d
394 5 and 6 of IVC was not efficient in reducing cytoplasmic lipid content of bovine
395 embryos. Additionally, IVC at a low oxygen tension without L-carnitine promotes
396 better conditions for embryo development when there was higher NO concentration in
397 the medium.

398

399 Keywords: embryonic development, Nile red, reactive nitrogen species, bovine.

400

401 **Introduction**

402 Approximately one million embryos (992,289) were produced *in vitro* globally
403 in 2017, which is a 48.9% increase compared to 2016 (Viana, 2018). However, embryos
404 produced *in vitro* were more likely to be transferred fresh (66.1%) than those embryos
405 produced *in vivo* (39.9%; Viana, 2018), likely resulting from the lower cryotolerance of
406 *in vitro* produced embryos (IVEP). In order to improve commercial success,
407 understanding the basic processes of embryo development is essential. Hence, many
408 studies have examined some of these basic processes such as researching embryo
409 metabolism and development under different conditions (Tesfaye *et al.*, 2006; Rocha-
410 Frigoni *et al.*, 2013; Zolini *et al.*, 2019).

411 Intracellular lipid accumulation has been postulated to be an important factor
412 influencing IVEP cryotolerance. L-carnitine, a small water-soluble molecule and
413 cofactor of β -oxidation, is crucial for the translocation of fatty acids into the
414 mitochondria, which are subsequently metabolized to acetyl-CoA through β -oxidation
415 and potentially produce ATP through oxidative phosphorylation (Sutton-McDowall *et*
416 *al.*, 2012). L-carnitine also has an antioxidant activity that protects cells from DNA
417 damage (Abdelrazik *et al.*, 2009). Several beneficial effects of L-carnitine
418 supplementation to culture media have previously been reported such as improved
419 embryo development (Sutton-McDowall *et al.*, 2012), lipid metabolism and
420 cryotolerance of bovine embryos (Takahashi *et al.*, 2013).

421 *In vitro* conditions cannot mimic *in vivo* conditions, which can lead to increased
422 levels of reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS; Agarwal *et*
423 *al.*, 2006), particularly when the culture is conducted under atmosphere oxygen tension
424 (20%), which is higher than an *in vivo* environment (5-7%). Reactive oxygen species
425 and RNS are free radicals generated as sub-products of oxygen consumption by the
426 electron transport chain during cellular respiration in the mitochondria (Liu *et al.*,
427 2002). However, ROS are necessary for follicles to establish pregnancy (Pasqualotto *et*
428 *al.*, 2004), as potential markers in patients for predicting the success of *in vitro*
429 fertilization (IVF; Attaran *et al.*, 2000) and during the *in vitro* maturation of oocytes
430 (Morado *et al.*, 2009). Additionally, RNS are necessary for the development of large
431 antral follicles (Zheng *et al.*, 2015; Dubey *et al.*, 2012), to stimulate meiotic maturation
432 in oocytes (Bu *et al.*, 2003; Viana *et al.*, 2007), in the ovulatory process (Jablonka-
433 Shariff and Olson, 1998), in early folliculogenesis up to the maturation step (Pires *et*
434 *al.*, 2009) and in preimplantation embryonic development (Tranguch *et al.*, 2003;
435 Tesfaye *et al.*, 2006). Furthermore, Inoue *et al.* (2000) determined that a cross-talk of
436 ROS and RNS can regulate circulation, energy metabolism, reproduction, embryonic
437 development and remodeling of tissues through apoptotic mechanisms and acts as an
438 important defense system against pathogens. Yet, excessive amounts of ROS and RNS
439 can promote DNA and RNA damage as well as promote several processes that can
440 impair embryo development (Finkel and Holbrook 2000).

441 Nitric oxide is an important representative of the RNS group and is produced
442 from L-arginine by action of nitric oxide synthase (NOS) enzyme, which is present in
443 three isoforms: neural (nNOS), endothelial (eNOS) and inducible (iNOS; Tesfaye *et al.*,

444 2006). All NOS isoforms have been observed in bovine oocytes and embryos (Tesfaye
445 et al., 2006). Additionally, Matta *et al.* (2009) showed that inhibition of NO derived
446 from iNOS during maturation affects the *in vitro* maturation of bovine COC, harming
447 meiosis development and cleavage and blastocyst development. To prevent
448 oxidative/nitrosative stress, culture conditions under low and high oxygen tensions have
449 been studied, however, these results tend to contradict each other (Rocha-Frigoni *et al.*,
450 2013; Takahashi *et al.*, 2000; Mingoti *et al.*, 2009). Therefore, further research into this
451 area is necessary. The aim of this study was to evaluate the production of bovine
452 embryos *in vitro* when supplemented with 3.03 mM L-carnitine for 24 h beginning on d
453 5 under 2 different oxygen tensions (20% or 5%) and the relationship of NO in the IVC
454 medium with embryo development *in vitro*.

455

456 **Materials and methods**

457 *Chemicals and medium*

458 Unless otherwise mentioned, the reagents used in this experiment were
459 purchased from Sigma (St. Louis, MO, EUA).

460

461 *Oocyte recovery*

462 Bovine ovaries (n = 493) were collected from a local abattoir and immediately
463 transported to the laboratory in 0.9% (w/v) saline solution supplemented with penicillin
464 G (100 IU / mL) and streptomycin sulfate (100 µg / mL) at 33–35°C within 1 h. In the
465 laboratory, 2 to 8 mm follicles were aspirated with syringes and needles (40x12).
466 Follicular fluid was kept in a water bath (37 °C) until sedimentation of contents and
467 pellet formation. Pellet contents were screened in medium containing 10% FCS and
468 DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline). The COC were then selected for IVM
469 according to the number of cumulus cell layers and cytoplasm homogeneity (Stojkovic
470 *et al.*, 2001).

471

472 *In vitro maturation (IVM)*

473 Selected COC were washed three times in TCM-199 (Tissue Culture Medium
474 199, Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FCS (Gibco) medium,
475 previously equilibrated for at least 1 h at 38.5°C under 5% CO₂ in humidified air, then
476 transferred to droplets of IVM medium containing TCM-199 plus 10% FCS, 0.011

477 g/mL sodium pyruvate, 1 µg/µL FSH, 5 µg/µL LH and 100 IU/mL penicillin/100 µg/mL
478 streptomycin. Groups of 25 COCs were cultured in 100 µL IVM medium in Petri plates
479 covered with mineral oil at 38.5°C, 5% CO₂ in air for 24 h.

480

481 *In vitro fertilization (IVF)*

482 At the end of the maturation period, groups of 25 oocytes were transferred to
483 100 µL drops of Fert-Talp supplemented with 5 mg/mL BSA, 0.2 mM pyruvate, 30
484 µg/mL heparin, 18 µM penicillamine, 10 µM hypotaurine, 1.8 µM epinephrine, 100
485 µg/mL streptomycin sulfate and 100 IU/mL penicillin and covered with mineral oil. The
486 oocytes were submitted to IVF with frozen semen from a single Nelore bull match with
487 proven fertility. Thawed sperm were washed in a discontinuous 45/90% Percoll gradient
488 (Parrish et al., 1995), and the concentration was adjusted to 2x10⁶ sperm/mL. Sperm
489 and COC were co-incubated under the same conditions as IVM for 18 - 22 hours.
490 Fertilization day was set to d 0.

491

492 *In vitro culture*

493 Presumptive zygotes were stripped of cumulus cells and spermatozoa by gentle
494 pipetting into embryonic culture medium and randomly distributed in systems with
495 either high O₂ (5% CO₂ und atmosphere O₂ tension) or low O₂ (5% CO₂, 5% O₂ and
496 90% N₂). For both systems, the culture medium was SOFaa plus BSA, sodium pyruvate,
497 penicillin/streptomycin, and supplemented with 5% FCS. Embryos were randomly
498 assigned to 1 of 4 treatment groups at d 5: high O₂ tension (High-Contr), high O₂ tension
499 + L-carnitine (High-Lcar), low O₂ tension (Low-Contr) or low O₂ tension + L-carnitine
500 (Low-Lcar). The High-Lcar and Low-Lcar treatments had 3.03 mM L-carnitine added
501 for 24 hours from d 5 to d 6. After this period, all groups were transferred to a fresh
502 SOF medium.

503 Seventy-two hours post-fertilization (D 3) the cleavage rate was evaluated. The
504 rate of blastocysts and their morphological classification (IETS, 1998) were performed
505 7 days after IVF (D 7). Hatching rate was calculated on D 9. Since some embryos were
506 removed on d 7 for staining, the hatching rate was calculated considering the embryos
507 remained in IVC. Five repetitions were performed with an average of 25 COC per
508 treatment.

509

510 *Measurement of NO concentration*

511 The determination of NO release in the culture medium was based on the
512 method of Ding et al. (1988). Two hundred μl were removed from the culture medium
513 on d 5, 6 and 9 after IVF and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Fifty μl aliquots of culture
514 medium were dispensed into a 96-well microplate, where an equal amount of Griess
515 Reagent was added. Griess reagent is composed of 1% NED (N-
516 naphthylethylenediamine in distilled water) and 1% sulfanilamide (1% in
517 phosphoric acid solution) solutions. The mixture was incubated at room temperature for
518 10 minutes and the optical density was determined by an ELISA reader at 540 nm. The
519 reading values were compared with the NaNO_2 standard curve (1.2 to 160 μM). Results
520 were expressed in μM of NO_2^- . The measurement of inorganic NO_2^- is used for indirect
521 quantification of NO production (Ricart-Jane et al., 2002)

522

523 *Measurement of lipid content in blastocysts*

524 Blastocysts on d 7 (n=70) post-insemination were randomly selected during
525 experimental replications and stained with Nile Red (Molecular Probes, Eugene, OR,
526 USA), a fluorescent dye for intracellular lipid droplets as previously described by
527 Sudano et al. (2016). The embryos were washed in a solution of 0.1% (wt/vol)
528 polyvinylpyrrolidone in phosphate-buffered saline solution (PVP-PBS) and fixed in 4%
529 (vol/vol) formaldehyde in PVP-PBS solution for 1 h. A stock solution was prepared by
530 dissolving Nile Red in DMSO at a concentration of 1 mg/mL and stored at -20°C .
531 Embryos were stained overnight with a work solution of 15 mg/mL of Nile Red in
532 PVP-PBS solution and stored in a dark refrigerator. Stained structures were washed
533 again in PVP-PBS, mounted on cover slips and examined under a fluorescence Zeiss
534 axio microscope at x40 magnification. Fluorescence intensity (FI) was quantified using
535 ImageJ 1.47 t software (version 1.60_65, Wayne Rasband; National Institutes of Health,
536 Washington DC, USA).

537

538 **Statistical analysis**

539 Statistical analyses were performed using the program Sisvar 5.6. Data on
540 cleavage rate, blastocyst production and embryonic development were submitted to
541 analysis of variance in a 2x2 factorial arrangement (two treatments and two oxygen
542 tensions).

543 For the processing of NO data, a completely randomized design was used in a
544 split-time plot with a 2x2x3 structure, that means 2 treatments (L-carnitine and control)
545 and two O₂ tension as plots and three days of collection, as sub-plot. In the case of a
546 statistically significant difference at 95% probability, the Tukey multiple comparison
547 test.

548 A P value of <0.05 was considered to be statistically different.

549

550 **Results**

551

552 The cleavage rate of zygotes did not differ ($P > 0.05$) when cultivated under high
553 (84%) or low oxygen tension (84.8%). Treatment had no effect on the blastocyst rate
554 (Table 1; $P = 0.47$), however, the hatching rate was higher for Low-Contr compared to
555 the other treatments ($P < 0.01$, Table 1).

556 Embryos observed on d 7 were classified according to their developmental stage
557 in order to verify if the cultivation conditions to which the probable zygotes were
558 submitted interfered in their development kinetics. Neither low O₂ tension nor L-
559 carnitine affected cultivation ($P > 0.05$), however, High-Lcar generated a higher
560 percentage of embryos in early stages of development (morula and early blastocyst)
561 compared to the other studied culture conditions ($P < 0.05$) and only around 2% of the
562 blastocysts were expanded.

563 We did not observe any differences in the lipid content of d 7 blastocysts
564 among groups after Nile Red staining (Figure 2).

565 Figure 3 shows the NO₂⁻ concentration of the IVC medium on d 5 (before
566 supplementation of L-carnitine), 6 (after L-carnitine treatment) and 9 (the last day of
567 culture) among groups. A triple correlation among variables could be observed. NO₂⁻
568 concentrations were similar across days for all treatments except for Low-Contr on d 9
569 ($P < 0.05$).

570

571 **Discussion**

572 Recently, Sudano et al. (2016) showed that cytoplasm lipid content in embryos
573 grown *in vitro* was highest at the morula stage and lowest at the blastocyst stage.
574 Therefore, we added 3.03 mM L-carnitine on d 5 when most embryos develop into the
575 morula stage. However, this treatment was removed on d 6 in order to decrease the risk

576 of further lowering the amount of lipids in blastocysts. Additionally, we evaluated the
577 incubation of IVC with and without L-carnitine under high or low oxygen tension. We
578 hypothesized that IVC supplemented with L-carnitine for 24 h in low oxygen tension
579 should produce more and better quality blastocysts and that the NO concentrations in
580 IVC medium would vary among groups.

581 Controversies regarding the production and quality of embryos produced *in vitro*
582 in low (Takahashi *et al.*, 2000; Guerin *et al.*, 2001; Kitagawa *et al.*, 2004) and high O₂
583 tensions (Corrêa *et al.* 2008; Mingoti *et al.*, 2009) have been observed. Because low
584 oxygen tension implies additional cost associated with reducing the oxygen
585 concentration, using atmospheric oxygen tension as a permanent IVEP condition would
586 reduce embryo production costs. In the present study, the blastocyst rate was similar in
587 all studied conditions; however, the highest rate of hatching was observed when IVC
588 was performed at low O₂ tension and in the absence of L-carnitine, which suggests that
589 this condition produces better quality embryos. Moreover, low O₂ tension has been
590 shown to improve quality and invasion ability of mice blastocysts, potentially
591 improving the implantation rate (Ma *et al.*, 2017; Bagheri *et al.*, 2018). We also
592 observed that when IVC was performed at a high O₂ tension in the absence of L-
593 carnitine the embryo development was slower, so that at d 7 a significantly lower
594 amount of expanded blastocysts was observed. Embryos transferred at the morula and
595 early blastocyst stages have been shown to have lower pregnancy rates than those
596 transferred at the blastocyst, expanded and hatched blastocyst stages (Zolini *et al.*,
597 2019), what allows us to associate the cultivation at high O₂ tension producing embryos
598 of lower quality.

599 A reduction of lipid content after culturing with L-carnitine was observed by
600 Takahashi *et al.* (2013) but not by Held-Hoelker (2017), probably because of
601 differences in IVP conditions. Additionally, the improvement of blastocyst rate in L-
602 carnitine supplemented IVC medium is controversial and may be related to O₂ tension
603 since embryos cultivated at high O₂ tensions showed improvement of blastocyst rate
604 (Takahashi *et al.*, 2013; Ghanem *et al.*, 2014) but not when cultivated at low O₂ tensions
605 (Held-Hoelker *et al.*, 2017; Zolini *et al.*, 2019). In the present study we could see any
606 benefit of L-carnitine addition on IVC, neither lipid content reduction nor improvement
607 of blastocyst and hatching rate. Most studies used L-carnitine for at least 3 days
608 (Takahashi *et al.*, 2013; Ghanem *et al.*, 2014; Held-Hoelker *et al.*, 2017; Zolini *et al.*,

609 2019), and as such, we believe that the supplementation of IVC medium for just 24 h
610 may not have been enough time to induce the expected results. Regardless, the role of
611 L-carnitine and lipid content in embryo development needs to be better understood
612 because supplementation showed better re-expansion rate after vitrification/warming
613 (Held-Hoelker *et al.*, 2017; Zolini *et al.*, 2019), but did not improve pregnancy rate of
614 vitrified/warmed embryos (Zolini *et al.*, 2019). Surprisingly, the embryos showing
615 the highest cryotolerance were not those bearing the lowest amounts of lipids, even after
616 cultivation in the presence of L-carnitine (Held-Hoelker *et al.*, 2017).

617 Nitric oxide is required for normal preimplantation embryo development but it
618 must be produced within a limited range of concentrations (Tranguch *et al.*, 2003;
619 Tesfaye *et al.*, 2006). Therefore, we evaluated in this study if NO concentrations in IVC
620 medium could be related to embryo development *in vitro* when supplemented with
621 antioxidant (L-carnitine) in different oxygen tensions (20% or 5%). Nitric oxide and
622 ROS can be generated by distinct enzymes or by the same enzyme through alternate
623 reduction and oxidation processes. Enzymatic uncoupling, changes in oxygen tension,
624 and the concentration of coenzymes and reductants can modulate the NO/ROS
625 production from these oxidoreductases and determine the redox balance in health and
626 disease (reviewed by Tejero *et al.*, 2019). It is known that lowering oxygen tensions
627 increases the biological activities of NO (reviewed by Inoue *et al.*, 2003) and that NO
628 protects many cell types against ROS toxicity, probably through the Nrf2/Srx pathway
629 (Abbas *et al.*, 2011). The addition of a NO inhibitor (10mM L-Name) in the IVC
630 impaired bovine blastocyst production (Teskaye *et al.*, 2006), highlighting the
631 importance of this substrate during bovine embryogenesis. In the present study NO was
632 measured in the IVC medium on d 5 (after L-carnitine addition), d 6 (after L-carnitine
633 remove) and d 9 (last day of IVC) and we could see that the amount of NO was greater
634 9 d post-insemination just in the group where zygotes were cultured under low O₂
635 tension and without L-carnitine. The same group showed a significantly higher hatching
636 rate on d 9, therefore we hypothesize that NO biological activity induced by low O₂
637 tension during IVC is related to the better development pattern of the embryos. In the
638 group LOW-LCAR, although IVC was performed under low O₂ tension, the LOW-
639 LCAR group unexpectedly had a lower NO concentration than LOW-CONTR.
640 However, it is possible that L-carnitine mediated a reduction of NO concentrations,
641 since a reduction of NO concentrations in testicular rats cells treated with L-carnitine

642 has been observed (Abd-Allah *et al.*, 2009). We did not find any description of the
643 mechanisms that lead L-carnitine to reduce NO concentrations in the literature,
644 however, the relationship between these two substances may possibly occur in the same
645 pathway, as the antioxidant mechanism of L-carnitine (Cao *et al.*, 2015) and NO (Abbas
646 *et al.*, 2011) occurs via the Nrf2 pathway. However, further research is needed to
647 elucidate these mechanisms in bovine embryos.

648

649 **Conclusion**

650

651 The addition of 3.03 mM L-carnitine between d 5 and 6 of IVC was not efficient
652 in reducing cytoplasmic lipid content of bovine embryos independent of incubation
653 oxygen tension. Additionally, IVC at low oxygen tension without L-carnitine promotes
654 better conditions for embryo development and is probably related to the NO
655 concentration in the medium.

656

657 **Financial support.** This research received no specific grant from any funding agency,
658 commercial or not-for-profit sectors

659

660 **Competing interests.** The authors declare that there is no conflict of interest that can be
661 perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

662

663 **Ethical standards.** Not applicable.

664

665 **References**

666 **Abbas K1, Breton J, Planson AG, Bouton C, Bignon J, Seguin C, Riquier S,**
667 **Toledano MB and Drapier JC** (2011) Nitric oxide activates an
668 Nrf2/sulfiredoxin antioxidant pathway in macrophages. *Free Radical Biology*
669 *and Medicine* **51**,107-114.

670 **Abd-Allah AR, Helal GK, Al-Yahya AA, Aleisa AM, Al-Rejaie SS and Al-**
671 **Bakheet SA** (2009) Pro-inflammatory and oxidative stress pathways which
672 compromise sperm motility and survival may be altered by L-carnitine.
673 *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2**, 73-81.

674 **Abdelrazik H, Sharma R, Mahfouz R and Agarwal A** (2009) L-carnitine
675 decreases DNA damage and improves the *in vitro* blastocyst development rate in
676 mouse embryos. *Fertility and sterility* **91**, 589-596.

- 677 **Agarwal A, Said TM, Bedaiwy MA, Banerjee J and Alvarez JG** (2006) Oxidative
678 stress in an assisted reproductive technique setting. *Fertility and Sterility* **86**,
679 503-512.
- 680 **Attaran M, Pasqualotto E, Falcone T, Goldberg JM, Miller KF, Agarwal A and**
681 **Sharma RK** (2000) The effect of follicular fluid reactive oxygen species on the
682 outcome of *in vitro* fertilization. *International Journal of Fertility and Women's*
683 *Medicine* **45**, 314-320.
- 684 **Bagheri D, Kazemi P, Sarmadi F, Shamsara M, Hashemi E, Joupari MD and**
685 **Dashtizad M** (2018) Low oxygen tension promotes invasive ability and embryo
686 implantation rate. *Reproductive biology* **18**, 295-300.
- 687 **Bu S, Xia G, Tao Y, Lei L and Zhou B** (2003) Dual effects of nitric oxide on
688 meiotic maturation of mouse cumulus cell-enclosed oocytes *in vitro*. *Mol. Cell.*
689 *Endocrinol* **207**, 21–30.
- 690 **Cao Y, Li X, Wang CJ, Li P, Yang B, Wang CB, and Wang LX** (2015) Role of
691 NF-E2-related factor 2 in neuroprotective effect of l-carnitine against high
692 glucose-induced oxidative stress in the retinal ganglion cells. *Biomedicine &*
693 *Pharmacotherapy* **69**, 345-348,
- 694 **Corrêa GA, Rumpf R, Mundim TCD, Franco MM and Dode MAN** (2008)
695 Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: effect in production
696 and expression of genes related to oxidative stress. *Animal reproduction*
697 *science* **104**, 132-142.
- 698 **Ding AH, Nathan CF and Stuehr D** (1988) Release of reactive nitrogen
699 intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal
700 macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent
701 production. *The Journal of Immunology* **141**, 2407-2412.
- 702 **Dubey PK, Tripathi V, Singh RP, Saikumar G, Nath A, Pratheesh MD, Gade N**
703 **and Sharma GT** (2012) Expression of nitric oxide synthase isoforms in
704 different stages of buffalo (*Bubalus bubalis*) ovarian follicles: Effect of nitric
705 oxide on *in vitro* development of preantral follicle. *Theriogenology* **77**, 280–291.
- 706 **Finkel T and Holbrook NJ** (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of
707 ageing. *Nature* **408** 239-247.
- 708 **Ghanem N, Ha AN, Fakruzzaman M, Bang JI, Lee SC and Kong IK** (2014)
709 Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced
710 *in vitro* and cultured with chemicals modulating lipid
711 metabolism. *Theriogenology* **82**, 238-250.
- 712 **Guerin P, El Moutassim S and Menezo Y** (2001) Oxidative stress and protection
713 against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its
714 surroundings. *Human reproduction update* **7**, 175-189.
- 715 **Held-Hoelker E, Klein SL, Rings F, Salilew-Wondim D, Saeed-Zidane M,**
716 **Neuhoff C, Tesfaye D, Schellander K and Hoelker M** (2017) Cryosurvival of

- 717 in vitro produced bovine embryos supplemented with l-carnitine and concurrent
718 reduction of fatty acids. *Theriogenology* **96**, 145-152.
- 719 **Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I and Utsumi K**
720 (2003) Cross talk of nitric oxide, oxygen radicals, and superoxide dismutase
721 regulates the energy metabolism and cell death and determines the fates of
722 aerobic life. *Antioxidants and Redox Signaling* **5**, 475-484.
- 723 **Inoue M, Sato EF, Park AM, Nishikawa M, Kasahara E, Miyoshi M, Ochi A**
724 **and Utsumi K** (2000) Cross-talk between NO and oxyradicals, a supersystem
725 that regulates energy metabolism and survival of animals. *Free radical research*
726 **33**, 757-770.
- 727 **Jablonka-Shariff A and Olson LM** (1998) The role of nitric oxide in oocyte
728 meiotic maturation and ovulation: Meiotic abnormalities of endothelial nitric
729 oxide synthase knock-out mouse oocytes. *Endocrinology* **139**, 2944–2954.
- 730 **Kitagawa Y, Suzuki K, Yoneda A and Watanabe T** (2004) Effects of oxygen
731 concentration and antioxidants on the in vitro developmental ability, production
732 of reactive oxygen species (ROS), and DNA fragmentation in porcine
733 embryos. *Theriogenology* **62**, 1186-1197.
- 734 **Liu Y, Fiskum G and Schubert D** (2002) Generation of reactive oxygen species by
735 the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry* **80**, 780-
736 787.
- 737 **Ma YY, Chen HW and Tzeng, CR** (2017) Low oxygen tension increases
738 mitochondrial membrane potential and enhances expression of antioxidant genes
739 and implantation protein of mouse blastocyst cultured in vitro. *Journal of*
740 *ovarian research* **10**, 47.
- 741 **Matta SG, Caldas-Bussiere MC, Viana KS, Faes MR, Paes de Carvalho CS,**
742 **Dias BL and Quirino CR** (2009) Effect of inhibition of synthesis of inducible
743 nitric oxide synthase-derived nitric oxide by aminoguanidine on the in vitro
744 maturation of oocyte–cumulus complexes of cattle. *Animal reproduction science*
745 **111**, 189-201.
- 746 **Mingoti GZ, Caiado Castro VS, Méo SC, Barretto LS and Garcia JM** (2009)
747 The effect of interaction between macromolecule supplement and oxygen
748 tension on bovine oocytes and embryos cultured in vitro. *Zygote* **17**, 321-328.
- 749 **Morado SA, Cetica PD, Beconi MT and Dalvit GC** (2009) Reactive oxygen
750 species in bovine oocyte maturation in vitro. *Reproduction, Fertility and*
751 *Development* **21**, 608–614.
- 752 **Parrish J, Krogenaes A and Susko-Parrish J** (1995) Effect of bovine sperm
753 separation by either swim-up or Percoll method on success of in vitro
754 fertilization and early embryonic development. *Theriogenology* **44**, 859-869.

- 755 **Pasqualotto EB, Agarwal A, Sharma RK, Izzo VM, Pinotti JA, Joshi NJ and**
756 **Rose BI** (2004) Effect of oxidative stress in follicular fluid on the outcome of
757 assisted reproductive procedures. *Fertility and Sterility* **81**, 973–976.
- 758 **Pires PRL, Santos NP, Adona PR, Natori MM, Schwarz KRL de Bem THC and**
759 **Leal CLV** (2009) Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of
760 cattle. *Animal Reproduction Science* **116**, 233–243.
- 761 **Ricart-Jane D, Llobera M, and Lopez-Tejero MD** (2002). Anticoagulants and
762 other preanalytical factors interfere in plasma nitrate/nitrite quantification by the
763 Griess method. *Nitric Oxide* **6**, 178-185.
- 764 **Robertson I and Nelson R** (1998): Certification and identification of the embryo. In:
765 Stringfellow DA, Seidel SM (eds), Manual of the International Embryo Transfer
766 Society, 3rd edn. International Embryo Transfer Society, Savoy, IL, USA, pp.
767 103–134.
- 768 **Rocha-Frigoni NA, Leão BC, Nogueira É, Accorsi MF and Mingoti GZ** (2013)
769 Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and
770 cryotolerance of bovine embryos at different periods of in vitro culture. *Zygote*
771 **23**, 159-168.
- 772 **Stojkovic M, Machado SA, Stojkovic P, Zakhartchenko V, Hutzler P, Gonçalves**
773 **P.B and Wolf E** (2001) Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate
774 content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with
775 morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and
776 culture. *Biology of reproduction* **64**, 904-909.
- 777 **Sudano MJ, Rascado TD, Tata A, Belaz KR, Santos VG, Valente RS, Mesquita**
778 **FS, Ferreira CR, Araújo JP, Eberlin MN and Landim-Alvarenga FD** (2016)
779 Lipidome signatures in early bovine embryo development. *Theriogenology* **86**,
780 472-484.
- 781 **Sutton-McDowall ML, Feil D, Robker RL, Thompson JG and Dunning KR**
782 (2012) Utilization of endogenous fatty acid stores for energy production in
783 bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* **77**, 1632-1641.
- 784 **Takahashi M, Keicho K, Takahashi H, Ogawa H, Schulte R and Okano A** (2000)
785 Effect of oxidative stress on development and DNA damage in in-vitro cultured
786 bovine embryos by comet assay. *Theriogenology* **54**, 137-145.
- 787 **Takahashi T, Inaba Y, Somfai T, Kaneda M, Geshi M, Nagai T and Manabe**
788 **N** (2013) Supplementation of culture medium with L-carnitine improves
789 development and cryotolerance of bovine embryos produced in
790 vitro. *Reproduction Fertility and Development* **25**, 589-599.
- 791 **Tejero J, Shiva S and Gladwin MT** (2019) Sources of vascular nitric oxide and
792 reactive oxygen species and their regulation. *Physiological reviews* **99**, 311-379.
- 793 **Tesfaye D, Kadanga A, Rings F, Bauch K, Jennen D, Nganvongpanit K, Holker**
794 **M, Tholen E, Ponsuksili S, Wimmers K, Montag M, Gilles M, Kirfel G,**

- 795 **Herzog V and Schellander K** (2006) The effect of nitric oxide inhibition and
796 temporal expression patterns of the mRNA and protein products of nitric oxide
797 synthase genes during in vitro development of bovine pre-implantation embryos.
798 *Reproduction in Domestic Animals* **41**, 501–509.
- 799 **Tranguch S, Steuerwald N and Huet-Hudson YM** (2003) Nitric oxide synthase
800 production and nitric oxide regulation of preimplantation embryo development.
801 *Biology of Reproduction* **68**, 1538–1544.
- 802 **Viana J** (2018) Statistics of embryo production and transfer in domestic farm
803 animals Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-
804 derived embryos were transferred worldwide.
- 805 **Viana KS, Caldas-Bussiere MC, Matta SG, Faes MR, de Carvalho CS and**
806 **Quirino CR** (2007) Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the
807 *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science* **102**, 217–
808 227.
- 809 **Zheng K, Sulieman FJ, Li J, Wei Q, Xu M and Shi F.** (2015) Nitric oxide and
810 thyroid hormone receptor alpha 1 contribute to ovarian follicular development in
811 immature hyper- and hypo-thyroid rats. *Reproductive. Biology* **15**, 27-33.
- 812 **Zolini AM, Carrascal-Triana E, Ruiz de King A, Hansen PJ, Alves Torres CA**
813 **and Block J** (2019) Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte
814 maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine
815 embryos produced in vitro.
- 816

817 Table 1: *In vitro* production of bovine embryos cultivated at high (20%) and low (5%)
 818 O₂ tension supplemented or not with 3.3 mM L-carnitine on IVC.

Group ¹	Blastocyst Rate ² %	Hatching rate % (D9)
High-Cont	29,4% (73/196) ^a	16,3% (6/37) ^b
High-Lcar	25% (56/221) ^a	2,4% 1 (1/28) ^b
Low-Cont	35% (73/201) ^a	35,3% (12/34) ^a
Low-Lcar	30,6% (69/219) ^a	16,3% (4/30) ^b
<i>P</i> -value	0.47	<0.01

819 ^{a-b} Different letters within columns represent significant differences ($P < 0.05$).

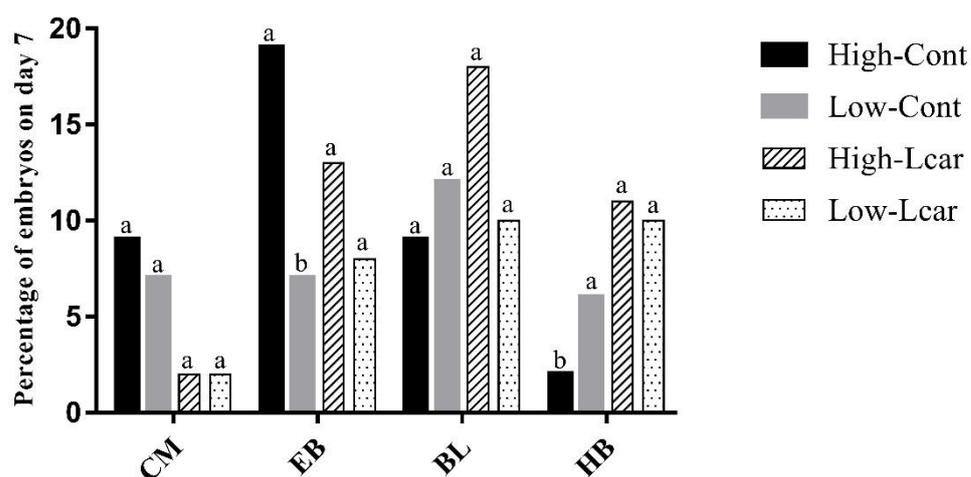
820 ¹High-Cont: O₂ high tension without L-carnitine; High-Lcar: O₂ high tension + L-carnitine;

821 Low-Cont: O₂ low tension without L-carnitine; Low-Lcar: O₂ low tension + L-carnitine

822 ²Blastocyst production rates were estimated considering the total number of oocytes in each
 823 maturation drop (IVF: d 0)

824

825

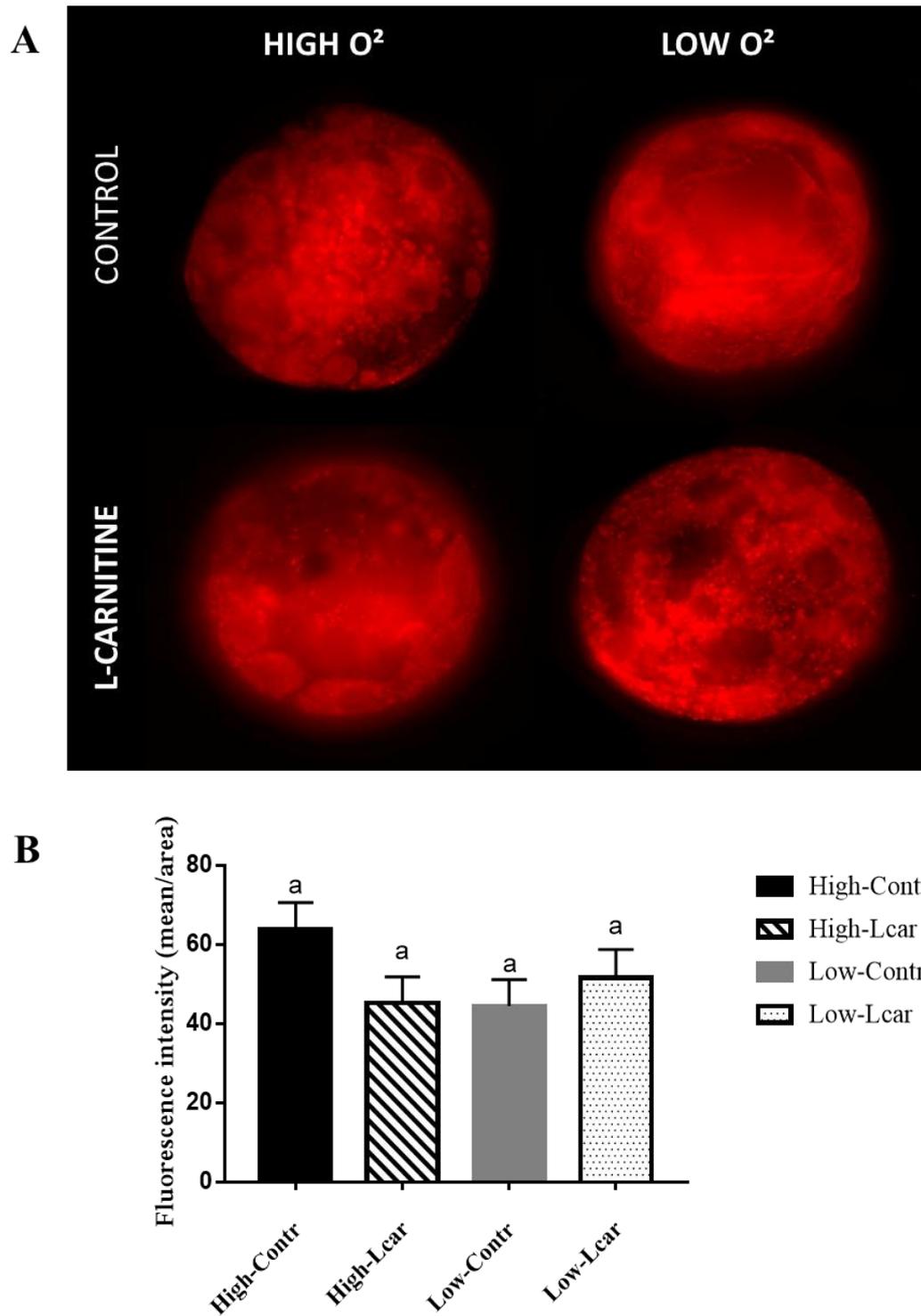


826

827 Figure 1 - Developmental stage of bovine embryos cultivated for 7 days in medium under high
 828 (20%) or low (5%) O₂ tension supplemented or not with 3.03 mM L-carnitine. CM: compact
 829 morula; EB: early blastocyst; BL: blastocyst; HB: hatched blastocyst. Different letters (a,b)
 830 above the bars indicate differences between treatments for each embryo developmental stage
 831 ($P < 0.05$).

832

833



834

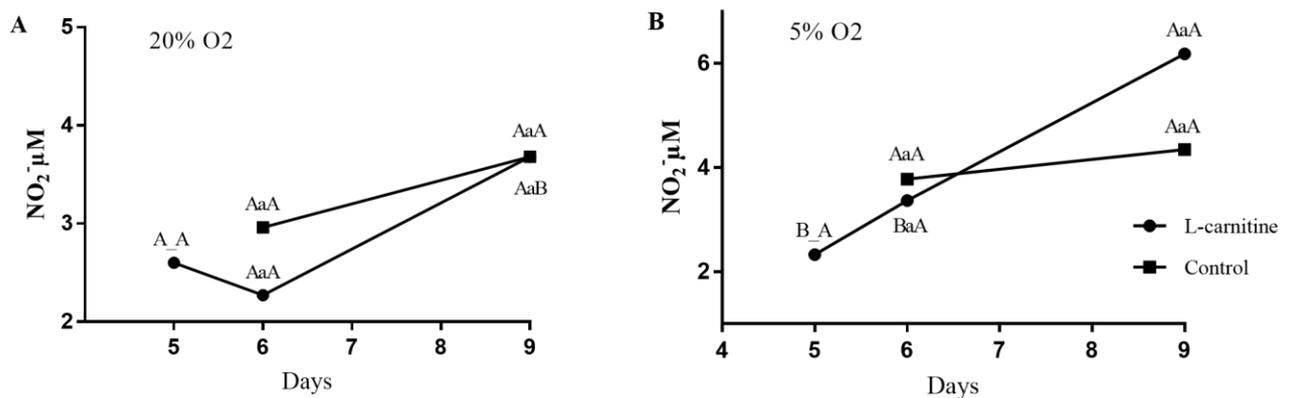
835 Figure 2: (A) Representative images of cytoplasmic lipid droplets labeled with Nile Red on

836 blastocysts cultured in low or high O₂, supplemented with L-carnitine. (B) Lipid content in

837 blastocysts (d 7) expressed by mean fluorescence intensity per area (least-squares mean ±

838 SEM). Values with common letters do not differ significantly ($P > 0.05$; n=13-20 per group).

839



840

841 Figure3: The NO₂⁻ concentration (uM) present in the medium on d 5, 6 and 9 of the *in vitro*
 842 culture of bovine embryos, with or without L-carnitine in high tension(A) and low O₂
 843 tension(B). The graph is presented so that at each point the interaction of the 3 variables can be
 844 observed, i.e. the NO concentration in a given oxygen tension and treatment. NO₂⁻ concentration
 845 is higher on d9 in the control group under low O₂ tension (p< 0,05). The first uppercase letter
 846 differentiates the days (5, 6 and 9 as sub-parcel), lowercase letter differentiates the group (with
 847 and without L-carnitine) and second uppercase letter differentiates O₂tension (high or low).

848

849

850

851