

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**REDUÇÃO DE SFB E USO DA L-CARNITINA NA
MATURAÇÃO PARA MELHORIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES BUBALINOS**

**Marivaldo Rodrigues Figueiró
Médico Veterinário**

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**REDUÇÃO DE SFB E USO DA L-CARNITINA NA
MATURAÇÃO PARA MELHORIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO*
DE EMBRIÕES BUBALINOS**

Marivaldo Rodrigues Figueiró

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia

Coorientadoras: Profa. Dra. Naiara Zoccal Saraiva

Profa. Dra. Marina Ragagnin de Lima

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária, área de Reprodução Animal

2018

F475r Figueiró, Marivaldo Rodrigues
Redução de SFB e uso da L-carnitina na maturação para
melhoria na produção *in vitro* de embriões bubalinos / Marivaldo
Rodrigues Figueiró. – – Jaboticabal, 2018
xix, 67 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: Joaquim Mansano Garcia.
Coorientadora: Naiara Zoccal Saraiva; Marina Ragagnin de Lima.
Banca examinadora: Lindsay Unno Gimenes, Fabio Morato
Monteiro, Nelcio Antônio Tonizza de carvalho, Eunice Oba
Bibliografia

1. Desenvolvimento embrionário. 2. Búfalo. 3. Lipídeos neutros. I.
Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:591.31:636.293.2

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria
Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

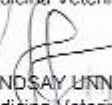
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: REDUÇÃO DE SFB E USO DA L-CARNITINA NA MATURAÇÃO PARA MELHORIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BUBALINOS

AUTOR: MARIVALDO RODRIGUES FIGUEIRO
ORIENTADOR: JOAQUIM MANSANO GARCIA
COORDENADORA: NAIARA ZOCCAL SARAIVA
COORDENADORA: MARINA RAGAGNIN DE LIMA

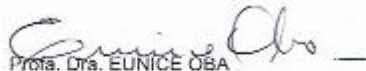
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em MEDICINA VETERINÁRIA, área: REPRODUÇÃO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOAQUIM MANSANO GARCIA
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Profa. Dra. LINDSAY UNNO GIMENES
Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Pesquisador FÁBIO MORATO MONTEIRO
Instituto de Zootecnia / Estação Experimental de Sertãozinho


Pesquisador Dr. NELCIO ANTÔNIO TONIZZA DE CARVALHO
APTA / Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Registro


Profa. Dra. EUNICE OBA
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia / FMVZ / UNESP / Botucatu

Jaboticabal, 19 de março de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARIVALDO RODRIGUES FIGUEIRÓ – nascido em Abaetetuba – PA, aos 23 dias do mês de maio de 1974; ingressou no curso de graduação em Medicina Veterinária pela Universidade Federal Rural da Amazônia, em 1996, sendo bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq desde 1997-2000, concluiu o curso superior em Medicina Veterinária em 2000. Em 2004, concluiu mestrado em Medicina Veterinária (Cirurgia e Clínica Veterinária) pela Universidade Federal Fluminense com bolsa de Mestrado do CNPQ. Em março de 2006 ingressou como Analista em Medicina Veterinária na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, onde desenvolve suas funções na Embrapa Amazônia Oriental. Em 2014, ingressou no curso de pós-graduação, em nível de Doutorado, no Programa de Medicina Veterinária, Área de Concentração em Reprodução Animal, na FCAV – UNESP de Jaboticabal.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela bênção da vida e por tudo o que me tem concedido até aqui, principalmente pela proteção, fé, força e coragem.

A eterna gratidão a todos que contribuíram direta e indiretamente na realização deste projeto.

A toda minha família pelos momentos a mim dedicados com amor, paciência e carinho, durante toda a minha vida.

Ao meu amado filho Joaquim de Aguiar Figueiró, pelo companheirismo, momentos de alegrias que faz ser a força motriz para conquistar meus objetivos.

A minha mãe, Felicidade Figueiró Braga, pelo amparo, amor, educação e constante incentivo.

A minha companheira Ellen Christina Canto Lobato, pelo incentivo, amor, amizade e carinho.

A Embrapa Amazônia Oriental pela disponibilização de sua infraestrutura e todo apoio na condução deste projeto.

Ao professor orientador Dr. Joaquim Mansano Garcia, pelo exemplo de mestre dedicado, pela confiança, amparo, oportunidade e ensinamentos transmitidos ao longo do período do curso.

A co-orientadora Dra. Naiara Zoccal Saraiva, pelo exemplo de pesquisadora, pela dedicação, paciência, amizade, pelos momentos felizes e ensinamentos transmitidos no decorrer deste projeto.

A co-orientadora Dra. Marina Ragagnin de Lima, pelo auxílio e ensinamentos transmitidos no decorrer deste projeto.

A equipe da Bioklone reprodução animal, pelo auxílio no desenvolvimento dos trabalhos.

Ao chefe-geral da Embrapa Amazônia Oriental, Dr. Adriano Venturieri e ao chefe adjunto de pesquisa, Dr. Walkymário de Paulo Lemos, pelo incentivo e por acreditarem em soluções para pecuária bubalina.

Aos criadores de búfalos José Melo da Rocha e João Paulo Mota Melo da Mota Rocha por ceder os bubalinos utilizados nas etapas iniciais do projeto.

A todos os professores os quais tive disciplina, pelo conhecimento transmitido e oportunidades proporcionadas.

Aos professores Fábio Morato Monteiro e Lindsay Unno Gimenes pela contribuição prestada para o projeto.

Aos meus orientadores de iniciação científica, os professores Manoel Malheiros Tourinho e Maria das Dores Correia Palha pelo incentivo, amizade, acolhimento e orientações prestadas.

Ao meu orientador de mestrado, o professor Firmino Marsico Filho (*in memoriam*), pelo incentivo, amizade e orientações prestadas.

Aos funcionários, Edson de Aguiar, Ivo Luiz de Almeida Jr e Roberta Vantini pela amizade e auxílio.

Aos meus estimados colegas e ex-colegas de pós-graduação, pela convivência e ajuda, especialmente ao colega Benjamim de Souza Nahúm pelo apoio durante a realização das disciplinas.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal – UNESP, em especial, ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal e à Pós-graduação, pelas instalações, condições de trabalho, acolhimento e oportunidade.

Epígrafe

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas”.

Carl Sagan

SUMÁRIO

CERTIFICADO CEUA.....	iii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	vii
RESUMO	vii
ABSTRACT	ix
 CAPÍTULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	 1
Introdução.....	1
Revisão de Literatura.....	3
1. Maturação <i>in vitro</i> de oócitos bubalinos durante a PIVE.....	3
2. Importância dos lipídeos nos oócitos e embriões produzidos <i>in vitro</i>	5
3. Efeitos da redução lipídica no desenvolvimento oocitário e embrionário.....	9
4. L- Carnitina.....	11
Referências.....	15
 CAPITULO 2. É POSSÍVEL ALTERAR O ACÚMULO LIPÍDICO EMBRIONÁRIO COM REDUÇÃO DO SFB E USO DE L-CARNITINA NA MATURAÇÃO <i>IN</i> <i>VITRO</i> DE OÓCITOS BUBALINOS	
Resumo.....	28
Abstract	29
1. Introdução.....	30
2. Material e métodos.....	31
2.1. Local dos experimentos e reagentes.....	31
2.2. Delineamento experimental.....	32
2.2.1 Experimento I. Efeitos da redução do SFB durante MIV na produção embrionária.....	32
2.2.2 Experimento II. Efeitos da adição de L-carnitina durante a MIV sobre o desenvolvimento embrionário e acúmulo lipídico.....	32
2.3. Obtenção de oócitos e de embriões produzidos <i>in vitro</i>	33
2.3.1 Seleção e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos.....	32
2.3.2. Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	33

2.4. Avaliação da atividade lipídica nos embriões produzidos in vitro.....	34
2.4.1. Ensaio de acúmulo lipídico com OilRed O.	34
2.4.2. Avaliação de acúmulo lipídico em microscopia confocal.....	35
2.5. Análise estatística.....	36
3. Resultados.....	36
3.1 Experimento I. Efeitos da redução do SFB durante MIV na produção embrionária.....	36
3.2 Experimento II. Efeitos da adição de L-carnitina durante a MIV sobre o desenvolvimento embrionário e acúmulo lipídico.....	37
4. Discussão.....	39
5. Suporte Financeiro.....	43
6. Declaração de interesse.....	43
7. Referências.....	43
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	50

CERTIFICADO CEUA



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

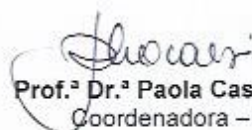


CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 024170/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Estratégias na MIV para incrementar a eficiência da produção *in vitro* de embriões bubalinos"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Joaquim Mansano Garcia está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 01 de dezembro de 2014.

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2014.


Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes
Coordenadora – CEUA

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Acetil CoA carboxilase
ANOVA	Análise de Variância
ApoC II	Apolipoproteína
ATP	Trifostato de adenosina
BSA-FAF	Albumina sérica bovina livre de ácidos graxos
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIV	Cultivo <i>in vitro</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
COA	Coenzima A
COC	Complexo <i>cumulus</i> -oócito
CPT1	Carnitina palmitoil tranferase 1
DAG	Diacilglicerol
FAC	Ácido graxo sintetase
FCAV	Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
FE	Fluido embriônico
FFAs	Ácidos graxos livres
GSH	Glutathiona
h	Horas
hCG	Gonadotrofina coriônica humana
In ²	Polegada ao quadrado
IP ₃	Inositol trifosfato
IP ₄	Inositol tetrafosfato
LC	L-Carnitina
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
mg	Miligramas
MII	Metáfase II
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
PBS	Tampão fosfato-salino

PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PKC	Proteína quinase C
PVA	Álcool polivinílico
PVP	Polivinilpirrolidona
RNA _m	RNA mensageiro
ROS	Espécies reativas do oxigênio
SBE	Soro de búfalo no estro
SFB	Soro fetal bovino
SSS	Substituto sintético de soro
TCM 199	Meio de cultura de tecido 199
VGBD	Rompimento da vesícula germinativa
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µm	Micrômetro
%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1. Esquema dos mecanismos propostos de mobilização e catabolismo de ácidos graxos livres no complexo *cumulus*-oócito. 7
- Figura 2. Entrada de ácido graxo na mitocôndria pelo transportador acil-carnitina/carnitina..... 12

Capítulo 2

- Figura 1. Demonstração de gotas lipídicas embrionárias após coloração com OilRed O (triglicerídeos e lipídeos neutros) e visualização em microscopia óptica..... 34
- Figura 2. Processamento da imagem original (A= núcleos corado com Hoechst 33342; B= Coloração de lipídios pelo Bodipy 493/503; C= Imagens sobrepostas) para a quantificação lipídica, por meio de microscopia confocal..... 35
- Figura 3. Área total de triglicerídeos e lipídeos neutros acumulados em embriões bubalinos oriundos de diferentes tratamentos durante a MIV, após coloração com “Oil Red O”..... 38
- Figura 4. Efeitos do acúmulo de lipídios neutros embrionário após diferentes tratamentos utilizados na MIV. 38

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1.	Taxa de produção de blastocistos após MIV de oócitos bubalinos em meios contendo diferentes concentrações de SFB.....	37
Tabela 2.	Desenvolvimento embrionário (taxas de clivagem e de blastocistos) sob diferentes concentrações de SFB, em associação ou não à L-carnitina (LC) durante a MIV de oócitos bubalinos.	37

REDUÇÃO DE SFB E USO DA L-CARNITINA NA MATURAÇÃO PARA MELHORIA DA PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BUBALINOS

Resumo: O maior rebanho bubalino da América Latina encontra-se no Brasil, fato que pode fazer do país um grande exportador de material genético da espécie. Nesse contexto, o desenvolvimento e o uso das biotécnicas da reprodução animal surgem como eixo central para aumentar a capacidade de multiplicação de material genético superior e promover o melhoramento animal. Desta forma, este estudo tem como objetivo validar protocolos que proporcionem a obtenção de embriões com maior qualidade e menor acúmulo lipídico, os quais estão apresentados em dois capítulos. O capítulo I, é composto de revisão bibliográfica abordando os estudos relacionados aos principais aspectos na maturação *in vitro* de oócitos bubalinos, importância dos lipídeos nos oócitos e embriões produzidos *in vitro*, efeitos da redução lipídica no desenvolvimento oocitário e embrionário e o emprego da L-carnitina na produção embrionária. No capítulo II, está apresentado um artigo composto de experimento I, o qual foi determinado a menor concentração de SFB no meio MIV que promovesse manutenção das taxas de desenvolvimento embrionário. No experimento II, foi avaliado a adição de 5 mM de L-carnitina nos meios de maturação e consequentemente foram submetidos à avaliação lipídica, por meio de técnicas de coloração em microscopia óptica e confocal. Onde concluímos que não houve diferenças em relação ao acúmulo lipídico embrionário e que possível reduzir a concentração de SFB até 5% nos meios de maturação *in vitro* para produção de embriões em bubalinos e a suplementação do meio com L-carnitina não proporciona aumento na produção embrionária.

Palavras-chave: Búfalos, Redução lipídica, lipídeos neutros, desenvolvimento embrionário.

REDUCTION OF FBS AND USE OF L-CARNITINE IN MATURATION TO IMPROVE THE *IN VITRO* PRODUCTION OF BUFFALOES EMBRYOS

Abstract: The largest buffaloes herd in Latin America is in Brazil, a fact that can make the country a great exporter of genetic material of the species. In this context, the development and use of biotechnics of animal reproduction arise as a central axis to increase the multiplication capacity of higher genetic material and promote animal improvement. In this way, this study train as objective validate protocols that provide the obtaining of embryos with higher quality and lower lipid accumulation, which are presented in two chapters. Chapter I, is composed of a bibliographical revision addressing the studies related to the main aspects of the *in vitro* maturation of oocytes buffaloes, importance of the lipids in the oocytes and *in vitro* embryos produced, effects of the reduction lipid in oocitário and embryonic development and the use of L-carnitine in embryonic production. In chapter II, an article composed of experiment I, which was determined the smallest concentration of fetal bovine serum (FBS) in the IVM environment that promoted the maintenance of the embryo development rates. In the experiment II, was evaluated the addition of 5 mM of L-carnitine in the means of maturation and consequently form subjected to the lipid evaluation, by means of coloring techniques in optical and confocal microscopy. Where we concluded that there were no differences in relation to embryonic lipid accumulation and that it could reduce the concentration of FBS up to 5% in the IVM methods for the production of embryos in buffaloes and the supplementation of the medium with L-carnitine does not provide increase in embryonic production.

Keywords: Buffaloes, lipid reduction, neutral lipids, embryo development, fetal bovine serum.

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

Introdução

A bubalinocultura é uma atividade recente no Brasil. No entanto, tem tido grande expansão, fazendo com que o efetivo de rebanho se torne o maior da América do Sul, seguido por Venezuela, Argentina e Colômbia (ANDRIGHETTO et al., 2005). Tem se apresentado uma atividade com grande contribuição para o atendimento da demanda alimentar, especialmente na região Norte do Brasil, apresentando vantagens em relação a outros ruminantes domésticos, principalmente no que diz respeito à rusticidade e adaptação às variadas condições climáticas e de manejo. A importância econômica na exploração desses animais reside também nas vantagens proporcionadas quanto à fertilidade, longevidade, eficiência de conversão alimentar e aptidão para produção de leite, carne e trabalho (LOURENÇO, 2005).

Apesar da espécie apresentar vantagens para sua exploração, é de suma importância que se procure estabelecer estratégias mais eficientes de exploração, dentre elas a implantação de alternativas alimentares, principalmente durante o período seco do ano, e uso de biotecnologias visando à redução nas idades de abate e ao primeiro parto (GARCIA, 2006).

O emprego das biotécnicas da reprodução na espécie bubalina representa um anseio da cadeia produtiva, a fim de atender as necessidades de multiplicação de material de alto potencial genético e, conseqüentemente, ganhos produtivos em curtos intervalos de tempo. No entanto, nesta espécie, ainda são encontrados alguns “entraves” reprodutivos que limitam a alta produtividade (KHAKI et al., 2014).

Nesse contexto, o desenvolvimento e a utilização das biotécnicas da reprodução animal, como a produção *in vitro* de embriões (PIVE), surgem como eixo central para aumentar a capacidade de multiplicação de material genético superior e promover o melhoramento animal sendo que a PIVE destaca-se pelo fato de ser cada vez mais difundida e utilizada comercialmente em vários países (OHASHI et al., 2006).

A PIVE é uma biotécnica reprodutiva que vem sendo utilizada em bubalinos, esta biotécnica tem apresentado algumas limitações para sua

produção em escala comercial, devidos aos baixos resultados alcançados com as taxas de blastocistos 16,7 % (GASPARRINI, 2002). Apesar da eficiência da PIVE ter aumentado nos últimos anos em búfalos, a taxa de clivagem ainda é baixa quando comparada a de outras espécies domésticas (GASPARRINI, 2008).

Diversos fatores demonstram ser importantes durante a MIV para o desenvolvimento embrionário. Dentre eles, podemos citar as mudanças nucleares e citoplasmáticas (GOTTARDI; MINGOTI, 2009), a competência oocitária (FERREIRA et al., 2009), fonte de obtenção dos oócitos (NEGLIA et al., 2003) e o tempo de maturação (NEGLIA et al., 2011).

Em bubalinos, a elevada concentração de lipídeos presentes no citoplasma dos oócitos e embriões também representa fator limitante ao sucesso da PIVE (GASPARRINI et al., 2002). Acredita-se que o soro fetal bovino (SFB), suplemento proteico normalmente utilizado nos meios de cultivo, esteja intimamente ligado a esse processo (ABE et al., 1999 e RIZOS et al., 2003). Diversos estudos têm buscado a redução do acúmulo lipídico, assim como o uso de reguladores do metabolismo lipídico no decorrer da PIVE, capazes de influenciar a expressão de genes reguladores do metabolismo de lipídeos e melhorar a competência de desenvolvimento e qualidade embrionária (GHANEM, et al., 2014, SPRICIGO et al., 2017).

Nesse contexto, a L-carnitina, vem sendo bastante estudada na PIVE, pela sua capacidade de transferir ácidos graxos livres de cadeia longa do citosol para mitocôndrias, onde serão oxidados promovendo geração de adenosina trifosfato (ATP) (KNITLOVA, et al., 2017; SPRICIGO et al., 2017; HELD-HOELKER, et al. 2017).

Assim, objetivo desta revisão é abordar aspectos importantes durante a maturação *in vitro* de oócitos bubalinos, mostrando o papel e a importância dos lipídeos nos oócitos e embriões e os efeitos d SFB e o uso da L-carnitina sobre o desenvolvimento embrionário da espécie bubalina.

Revisão de Literatura

1. Maturação *in vitro* de oócitos bubalinos durante a PIVE

Durante o procedimento de PIVE, a maturação *in vitro* (MIV) dos oócitos é considerada uma etapa de grande relevância, pelo fato de que nesta fase os oócitos adquirem competência para realizar outras subseqüentes fases de desenvolvimento, as quais englobam desde a ativação do genoma embrionário até a formação dos blastocistos e o estabelecimento da gestação (FERREIRA et al., 2009; SOMFAI et al., 2011).

As mudanças nucleares e citoplasmáticas na MIV, são importantes e devem ser levados em consideração para a produção embrionária. Nesta etapa ocorrem diversas, que tornarão o oócito preparado para a etapa seguinte, que é a fecundação. Tais mudanças nucleares do oócito estão relacionadas à progressão do oócito desde o primeiro bloqueio meiótico na prófase I, até o estágio de metáfase II (MII), quando ocorre a quebra da vesícula germinativa (*vesicle germinal break down* – VGBD), condensação dos cromossomos, extrusão do primeiro corpúsculo polar e formação do segundo fuso meiótico (SIRARD et al., 2001). Para completar esse processo de maturação do oócito, é necessária a complementaridade de outros eventos, dentre eles, a redistribuição das organelas citoplasmáticas, estocagem de RNAm (RNA mensageiro), síntese de proteínas e fatores de transcrição (FERREIRA et al., 2009; FU et al., 2016).

Durante a maturação citoplasmática, ocorrem diversos eventos, tais como: síntese de proteínas intracelulares (EDWARDS et al., 1997), redistribuição dos grânulos corticais (PAYTON et al., 2003), reorganização dos microtúbulos (KIM, 2000) e migração e redistribuição das organelas dentro do citoplasma (ANGUITA et al., 2008).

Estudos realizados por Mondadori et al. (2010) relatam que em bubalinos, durante a maturação, ocorre migração dos *clusters* mitocondriais, do retículo endoplasmático liso e rugoso e do complexo de Golgi para a periferia do oócito. Associado a isto, também é relatada a ocorrência de multiplicação e migração periférica dos grânulos corticais, modificação morfológica dos grânulos de lipídeos no citoplasma, aumento do espaço perivitelino perinuclear e redução gradativa do contato entre as células *cumulus* (COC) e o oócito.

Um fator importante nesse processo é a competência oocitária, que é a capacidade do oócito em concluir todas as etapas da maturação nuclear e citoplasmática, ser fecundado, completar o desenvolvimento embrionário e dar origem ao feto (FERREIRA et al., 2009). Assim, para que o oócito se torne competente, o mesmo deverá ter completado toda sua fase de crescimento, que ocorre quando o oócito alcança 145 μ m em bubalinos (NANDI et al., 2002). A aquisição da competência oocitária em bubalinos pode ser influenciada por fatores tanto ambientais, como o efeito da estação do ano e variações térmicas, quanto inerentes ao próprio oócito (DI FRANCESCO et al., 2011; EL-NABY et al., 2013). Folículos maiores que 4 mm são considerados em bubalinos ideais para obtenção de melhores resultados na produção *in vitro* de embriões (YOUSAF; CHOCHAN, 2003).

A fonte de obtenção dos oócitos em bubalinos é outro fator capaz de influenciar a aquisição da competência. Este fato foi comprovado quando ovários foram coletados de frigorífico e os oócitos se apresentaram baixa capacidade de se tornar blastocistos em comparação a quando foram coletados de ovários através da OPU (NEGLIA et al., 2003).

Além dos diversos fatores que afetam o desenvolvimento do embrião bubalino *in vitro*, vale ressaltar que a duração da MIV também é importante, uma vez que o tempo inadequado de maturação pode levar a anormalidades nos cromossomos (NEGLIA et al., 2011) e redução das taxas de clivagem e de blastocistos (GASPARRINI et al., 2008).

Uma proporção do oócitos bubalinos atinge a MII no período de 15-21 horas, sendo que o menor tempo de maturação pode ser explicado pelas diferenças nas condições da MIV ou pela qualidade inerente aos próprios oócitos, que nesta espécie é também afetada pela sazonalidade (GASPARRINI, 2007). Além disso, há resultados que comprovam aumento na extrusão completa dos cromossomos nos oócitos bubalinos no período de 20-24 horas de MIV, o que leva a concluir que a extensão do tempo de MIV em búfalos poderia implicar na redução do desenvolvimento embrionário (NEGLIA et al., 2001).

A qualidade dos oócitos está diretamente ligada ao sucesso do seu desenvolvimento. Um dos aspectos fundamentais neste contexto é a composição dos meios de cultivo empregados nas três etapas que compõem a PIVE. Algumas

linhas de pesquisa em PIVE de bubalinos buscam o enriquecimento do meio de cultivo com antioxidantes para melhorar a produção de blastocistos (GASPARRINI et al., 2006; SINGHAL et al., 2009).

Gasparini et al. (2002; 2006) estudaram os efeitos da adição de compostos derivados de tiol, e observaram que o acréscimo de cisteamina e/ou cistina aos meios de cultivo melhorou as taxas de maturação e de blastocistos.

Em bubalinos, a elevada concentração de lipídeos presentes no citoplasma dos oócitos e embriões também representa um fator limitante (GASPARRINI et al., 2002).

Neste aspecto, a necessidade do desenvolvimento de meios de maturação associados à suplementação com diferentes substâncias, como fatores de crescimento e antioxidantes, tem se tornado objeto de estudo de diversas pesquisas (NANDI et al., 2002; PUROHIT et al., 2005; ANAND et al., 2008; SINGHAL et al., 2009; ROCHA-FRIGONI et al., 2016).

Acredita-se que o SFB, suplemento proteico normalmente utilizado nos meios de cultivo, esteja intimamente ligado a esse processo promova o excessivo acúmulo de gotas lipídicas citoplasmáticas, fato relacionado à diminuição da criotolerância dos embriões (ABE et al., 1999; RIZOS et al., 2003).

De qualquer forma, a total substituição do SFB na PIV de embriões ainda é um grande desafio, visto que de maneira geral, os meios suplementados com esta fonte proteica ainda são os que apresentam as melhores taxas de produção embrionária (DUQUE et al., 2003).

2. Importância dos lipídeos nos oócitos e embriões produzidos *in vitro*

Com o advento de novas biotecnologias, tem-se tornado claro que a competência embrionária pode ser severamente comprometida sem alterações morfológicas perceptíveis, porém, com diferenças metabólicas encontradas no início do desenvolvimento embrionário. Uma dessas alterações está no grande acúmulo lipídico nos embriões durante a PIVE. Este fato tem sido associado com baixa capacidade de criopreservação e menor potencial de desenvolvimento embrionário (APARICIO et al., 2013; GONZÁLEZ-SERRANO et al., 2013; GHANEM et al., 2014; MILAZZOTTO et al., 2016).

As gotas lipídicas embrionárias podem ser encontradas em associação com diversas organelas ligadas ao metabolismo celular, como mitocôndrias, retículo endoplasmático, endossomas, peroxissomas e citoesqueleto (THIELE; SPANDL, 2008; AMBRUOSI et al., 2009; WALTHER; FARESE, 2009). Durante a maturação dos oócitos, a atividade e organização das gotas lipídicas e das mitocôndrias são particularmente relevantes, uma vez que a fosforilação oxidativa é a principal via para fornecer ATP para atividades celulares (WANG; SUN, 2007).

As mitocôndrias e as gotas lipídicas estão intimamente relacionadas e são consideradas de grande importância pelo fato de serem responsáveis pelo suporte energético de qualquer célula. Quando ocorre demanda de energia na célula, ácidos graxos são metabolizados na mitocôndria via β -oxidação para obtenção de ATP. Esses ácidos graxos podem ser provenientes da quebra da gota lipídica por lipoproteínas (lipases) ou biossíntese celular. Neste processo, a lipase extracelular ligada às paredes capilares por proteoglicanos de sulfato de heparina é ativada pela apolipoproteína ApoC-II na superfície das lipoproteínas circulantes, hidrata os ácidos graxos livres liberadores de lipoproteína triacilglicerol, que podem então ser absorvidos pelas células (DUNNING et al., 2014). Assim, as enzimas lipases e a atividade são detectadas em células *cumulus* e provavelmente serão reguladas durante o processo de maturação. Com base em seus papéis em outras células, propõe-se que as lipases extracelulares possam mediar a transferência de ácidos graxos de lipoproteínas de líquido folicular em células *cumulus* e que as lipases intracelulares através de interações com proteínas de gotículas lipídicas, como Perilipin-2, que é expressa em oócitos, liberam ácidos graxos das gotículas lipídicas do oócito (figura 1) (YANG et al., 2010, AARDEMA et al., 2011).

A relação negativa existente entre o excesso de lipídeos na PIVE e a criotolerância embrionária, juntamente aos problemas causados por concentração de *espécies reativas do oxigênio* (ROS), são os motivos pelos quais tem se estudado o acúmulo lipídico em oócitos e embriões produzidos *in vitro*, embora a alta quantidade de lipídeos seja um fator limitante para a criopreservação, existe a necessidade da presença dessas estruturas devido ao fornecimento energético (DUNNING et al., 2014)..

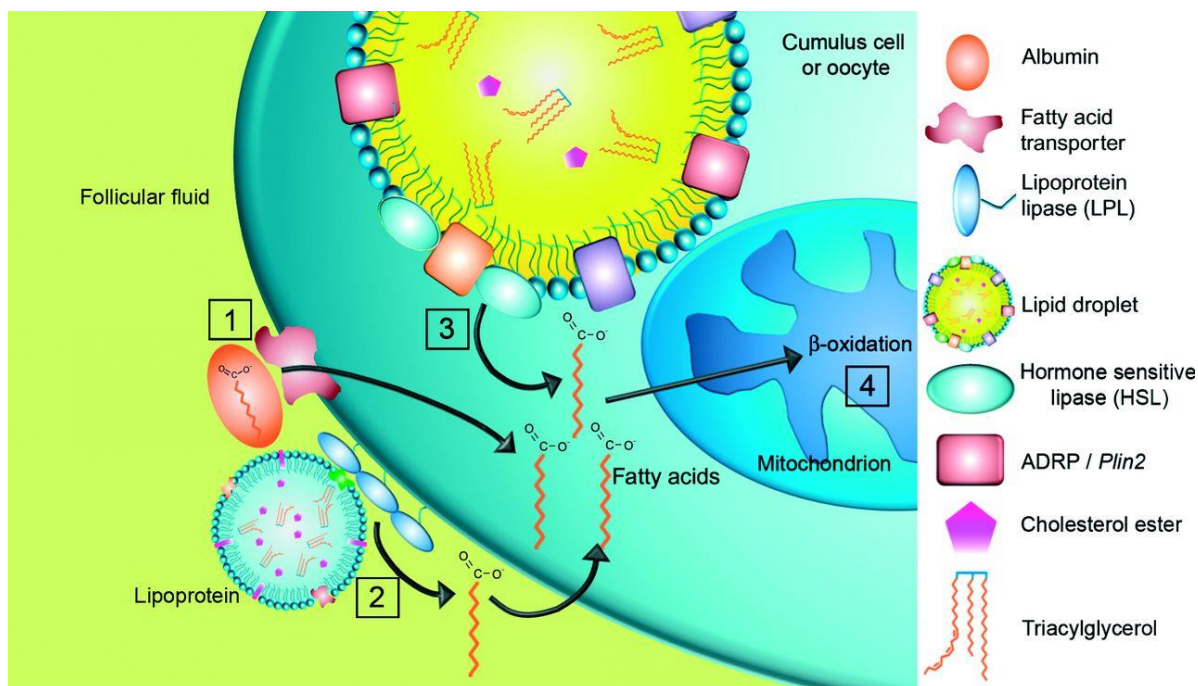


Figura 1. Esquema dos mecanismos propostos de mobilização e catabolismo de ácidos graxos livres no complexo *cumulus*-oócito. (1) Os ácidos graxos livres (FFAs) no fluido folicular são ligados à albumina. (2) A mobilização de triacilglicerol a partir de lipoproteínas. (3) O triacilglicerol intracelular é armazenado em células *cumulus* e oócitos dentro de gotículas lipídicas. (4) Os ácidos graxos livres disponíveis para o metabolismo via β -oxidação nas mitocôndrias (DUNNING et al., 2014).

Durante a β -oxidação, são liberadas as espécies reativas de oxigênio (ROS) que, em alta concentração, podem lesionar as mitocôndrias, comprometendo seu funcionamento (DUVNJAK et al., 2007). Porém, o acúmulo excessivo de gotas lipídicas no embrião é prejudicial à sua criotolerância, pois os ácidos graxos livres liberados pela lipólise das gotas lipídicas podem penetrar a membrana plasmática, mudando a composição e provocando a diminuição de fluidez da mesma, resultando em embriões menos resistentes às técnicas de criopreservação (GOMEZ et al., 2008). Assim, aparentemente existe um limiar máximo e um limiar mínimo para a quantidade de lipídeos presentes em oócitos e embriões.

Os lipídeos intracelulares mais abundantes armazenados nos oócitos são os triacilgliceróis, representando aproximadamente 36 e 46% de ácidos graxos

total em bovinos e suínos, respectivamente (MCEVOY et al., 2000). Estes podem ser utilizados na β -oxidação mitocondrial para produzir energia durante a maturação (STURMEY et al., 2016), assim como desenvolvem ação crucial na formação de membranas durante as divisões celulares nos oócitos (MCEVOY et al., 2000).

Nesse contexto, podemos destacar o papel dos fosfolípidos na síntese dos segundos mensageiros durante a maturação dos oócitos e o desenvolvimento embrionário. Por exemplo, em oócitos de suínos, o fosfatidilinositol representa 6% dos fosfolípidos totais. A hidrólise deste fosfolípido de membrana produz dois segundos mensageiros, inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 e sua derivada inositol tetrafosfato (IP4) aumentam as concentrações de Ca^{+2} , enquanto o DAG estimula a Proteína Quinase C (PKC), sendo particularmente importantes na maturação dos oócitos e na capacidade de fertilização (WU et al., 2006) .

O teor de lipídeos nos oócitos pode ser alterado pelo ambiente de maturação, devido ao uso dos suplementos de soro. Os oócitos bovinos maturados em 10% de SFB possuem mais triacilglicerol e mais colesterol do que aqueles maturados em condições isentas de soro (KIM et al., 2001). É importante ressaltar que o SFB contém uma série de fatores de crescimento, citoquinas e metabólitos, que podem aumentar os lipídeos intracelulares através da absorção de ácido graxos mediada pelo transportador e/ou biossíntese de triglicerídeos. Também é provável que as células *cumulus* influenciem diretamente a deposição de triacilglicerol e/ou ácido graxos dos oócitos, semelhante ao seu papel no controle do conteúdo de colesterol (SU et al., 2008).

Há pouca evidência de como o teor de lipídeos do oócito pode influenciar a competência. Existem exemplos, como oócitos de ratos com baixa competência de desenvolvimento, com mais gotículas lipídicas em comparação com oócitos que possuem capacidade de desenvolvimento fisiologicamente normal; no entanto, os oócitos menos competentes também apresentam outras diferenças citoplasmáticas fundamentais (MONTI et al., 2013). Assim, é necessário um trabalho adicional para entender se o conteúdo de lipídeos de oócitos (ou células *cumulus*) pode ser um biomarcador de competência e, o que é mais importante,

como as alterações fisiológicas ou *in vitro* ao conteúdo de lipídeos de COC pode afetar o desenvolvimento embrionário (DUNNING et al., 2014).

As variações no teor de lipídeos de oócitos em diferentes espécies são indicativas de requisitos fisiológicos distintos durante o desenvolvimento precoce do embrião. Certamente, os ácidos graxos de cadeia longa prevalentes em oócitos de mamíferos são ricos em energia e diferentes níveis de ácidos graxos insaturados, como o ácido oleico, podem influenciar a fluidez da membrana celular. Isto é ilustrado pelo fato de que o conteúdo lipídico influencia a viabilidade dos oócitos após a criopreservação, alterando a integridade da membrana (ZHANG et al., 2012).

Assim, é importante que se mantenha um equilíbrio entre a quantidade de lipídeos nos oócitos e nos embriões, visto que seu excesso prejudica o processo de criopreservação e sua falta leva a um menor aporte de energia às células. Nesse sentido, é muito importante que novas estratégias envolvendo a otimização do processo de β -oxidação sejam desenvolvidas *in vitro* (DUNNING et al., 2014).

3. Efeitos da redução lipídica no desenvolvimento oocitário e embrionário

Com o objetivo de reduzir a quantidade lipídica nos sistemas de cultivo da PIVE, diversos estudos têm sido realizados com o intuito de remover o SFB neste processo, por meio da sua substituição ou mesmo da redução de sua concentração (FEUGANG et al., 2009), visando o uso de meios definidos (LIM et al., 2008; MINGOTI et al., 2011).

Esse fato se justifica em decorrência do SFB ser um composto rico em ácidos graxos e, sabendo-se da capacidade destes de serem transportados até o citoplasma oocitário, seria esperado o aumento de lipídeos nos oócitos, podendo promover ação prejudicial (DEL COLLADO et al., 2014). Tal fato pode ser prejudicial para embriões bubalinos, uma vez que foi demonstrado num estudo ultraestrutural a abundância de grânulos citoplasmáticos caracterizados por alto teor lipídico em oócitos desta espécie (BONI et al., 1992; GASPARRINI, 2002). É provável que oócitos e embriões de búfalos sejam mais sensíveis ao estresse oxidativo, devido ao seu alto conteúdo lipídico (GASPARRINI et al., 2006).

Por outro lado, a suplementação do SFB apresenta efeitos favoráveis durante maturação de oócitos em bubalinos, uma vez que este composto possui

fatores de crescimento que possuem importante papel na regula a maturação oócito, além de impedir a diminuição de fluidez da zona pelúcida (MAHMOUD; NAWITO, 2003).

Apesar de serem desconhecidos exatamente quais são os fatores que o SFB possui e que permitem a obtenção de melhores taxas de desenvolvimento embrionário, por não ser um componente totalmente definido em termos de composição, sabemos que o SFB é um meio composto por albumina, ácidos graxos, aminoácidos, vitaminas e fatores de crescimento. Tais compostos são responsáveis por melhorar a expansão das células *cumulus*, o que parece ser necessário para que ocorra a adequada maturação, tanto nuclear quanto citoplasmática com reflexos diretos no desenvolvimento embrionário (ABE; HOSHI, 2003).

Um dos mecanismos que explica a importância dos lipídeos nos eventos durante a maturação nuclear está na relação entre a β -oxidação e a reativação da meiose (DOWNS et al., 2009 e DUNNING et al., 2010). Tal mecanismo ocorre por meio da ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a qual promove quebra da vesícula germinativa e reativação da meiose (CHEN et al., 2006). Neste evento, a acetil-CoA carboxilase (ACC) é a principal responsável pela ativação da MAPK (DOWNS et al., 2009). Apesar de ser a oxidação dos ácidos graxos uma das maiores consequências da ativação da MAPK, pela diminuição dos níveis do malonil-CoA, estudos demonstraram que a inibição da oxidação dos lipídeos impede, por sua vez, a reativação da meiose (DOWNS et al., 2009 e DUNNING et al., 2010).

Em estudo realizado em búfalos, com o intuito de avaliar os efeitos do SFB e do soro de búfalo no estro (SBE) durante a MIV, foi verificado que a taxa de maturação dos oócitos foi maior nos grupos onde se utilizou SFB. Isso pode estar relacionado ao efeito de fatores de crescimento, nutrientes e antioxidantes presentes no SFB (PURI et al., 2015).

Del Collado et al. (2014) utilizaram albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF) e um produto comercial denominado fluido embriônico (FE), de maneira isolada e em diferentes combinações e concentrações, e concluíram que é possível reduzir a concentração de SFB no meio de MIV de bovinos em até

3,5%, sem prejuízo significativo aos índices de maturação nuclear e citoplasmática.

Outros estudos demonstraram que a adição de diferentes compostos de tiol (cistina, cisteína, cisteamina, glutathione [GSH], β -mercaptoetanol) aos meios MIV melhoram o desenvolvimento embrionário, aumentaram concentração intracitoplasmática de GSH e protegeram as células do estresse oxidativo da cultura (PARAMIO, 2010; WANI et al., 2012).

Del Collado et al. (2015) relataram que meios utilizados na MIV, contendo SFB em alta concentração (10%), aumentam o conteúdo de lipídeos totais em 18 vezes, resultando em maior acúmulo de lipídeos em oócitos bovinos, quando se compara ao uso de meios contendo apenas BSA. Pelo fato do SFB possuir componentes que levam ao acúmulo lipídico, meios suplementados com esse composto podem resultar em embriões sensíveis à criopreservação. Além disso, o SFB pode provocar danos na membrana mitocondrial e alteração na expressão de genes importantes para o correto desenvolvimento embrionário (RIZOS et al., 2003, WRENZYCKI et al., 2007).

Ainda existem controvérsias sobre o comportamento dos lipídeos durante a MIV nas diferentes espécies, estando relatado, por exemplo, diminuição do acúmulo na espécie suína (ROMEK et al., 2010) e aumento na murina (YANG et al., 2010).

Apesar de alguns estudos buscarem substituir o SFB nos meios usados na PIVE, com o objetivo de se reduzir o acúmulo lipídico, recentemente têm surgido estratégias que envolvem a otimização do processo de β -oxidação, como o uso da L-carnitina, por exemplo, nas etapas de MIV e CIV.

4. L- Carnitina

A L-carnitina (3-hidroxi-4-N-trimetilamino--butirato) é uma amina quaternária, que foi primeiramente isolada de músculo bovino por cientistas russos em 1905, sendo que apenas o isômero levógiro (L-carnitina, LC) foi encontrado como composto bioativo. Este composto, que tem função fundamental na geração de energia pela célula, vem sendo bastante estudado, pois age nas reações transferidoras de ácidos graxos livres de cadeia longa do citosol para

mitocôndrias, facilitando sua oxidação e geração de adenosina trifosfato (ATP) (KERNER, HOPPEL, 1998).

Esta amina constitui fator importante no transporte de ácidos graxos, por meio das membranas mitocondriais. Quando ocorre demanda de energia na célula, ácidos graxos são metabolizados na mitocôndria via β -oxidação, para obtenção de ATP. Esses ácidos graxos podem ser provenientes da quebra da gota lipídica por lipases ou de biossíntese celular. Os ácidos graxos destinados à oxidação mitocondrial estão transitoriamente ligados ao grupo hidroxil da carnitina, formando acil-graxo-carnitina. Essa transesterificação é catalisada pela carnitina aciltransferase I, na membrana externa. O éster de acil-graxo-carnitina então entra na matriz por difusão facilitada através do transportador acil-carnitina/carnitina da membrana mitocondrial interna. No terceiro e último passo do circuito da carnitina, o grupo acil-graxo é enzimaticamente transferido da carnitina para a coenzima A intramitocondrial pela carnitina-aciltransferase II (DUNNING; ROBKER, 2012; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012; NELSON; COX, 2014). Essa isoenzima, localizada na face citosólica da membrana mitocondrial interna, regenera a acil-CoA graxo e a libera, juntamente com a carnitina livre, dentro da matriz (Figura 2) (NELSON; COX, 2014).

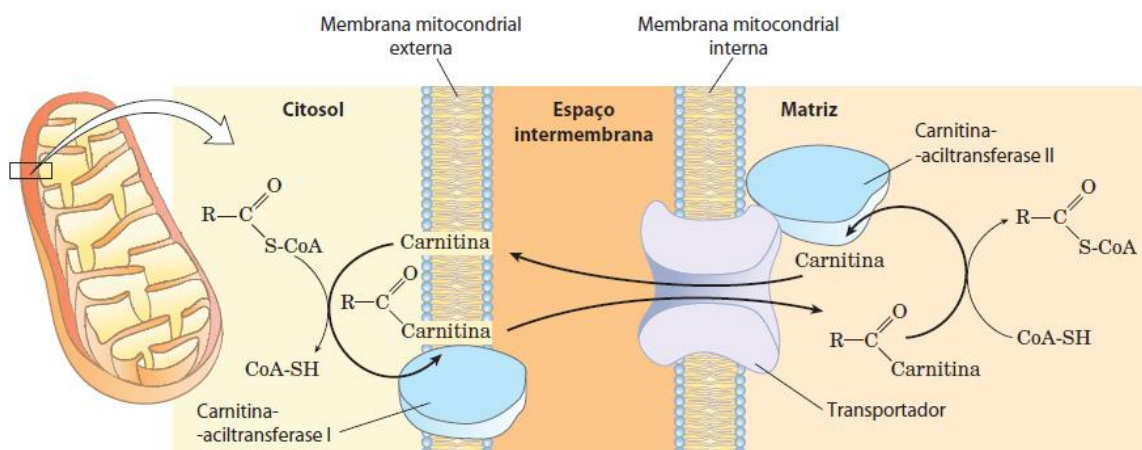


Figura 2. Entrada de ácido graxo na mitocôndria pelo transportador acil-carnitina/carnitina (NELSON; COX, 2014).

De acordo com Downs et al. (2009) o acetil-CoA é convertido em malonil-CoA pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC) que, por sua vez, será convertido em ácido graxo pela enzima ácido graxo sintetase (FAC). Em caso de requerimento energético, o ácido graxo é metabolizado em acil-CoA graxo, que

será transportado até o interior da mitocôndria mediante carnitina e o receptor celular denominado carnitina palmitoil tranferase 1 (CPT1). Por outro lado, quando há necessidade de lipogênese, o malonil-CoA inibe o CPT1 para que não ocorra a β -oxidação dos ácidos graxos (RUDERMAN et al., 2003).

Além da L-carnitina desenvolver importante função na oxidação dos ácidos graxos, também tem propriedade antioxidante, atribuída à sua capacidade de melhorar funções mitocondriais (MINGORANCE et al., 2011). Em diversas espécies, a utilização de L-carnitina nos meios de cultivo de folículos, maturação oocitária e cultivo de desenvolvimento embrionário *in vitro* tem apresentado efeito benéfico, como por exemplo, nas taxas de maturação nuclear (meiose II) dos oócitos, taxas de fertilização, clivagem dos embriões, taxas de produção embrionária e quantidade de células presentes na massa celular interna de blastocistos, além da redução no conteúdo lipídico de embriões (DUNNING et al., 2010; SOMFAI et al., 2011; SUTTON-MCDOWALL et al., 2012).

A L-carnitina tem sido usada em diferentes espécies, tais como bovinos (YAMADA et al 2006; CHANKITISAKUL et al., 2013; PHONGNIMITR et al., 2013a; KNITLOVA, et al., 2017; SPRICIGO et al., 2017; HELD-HOELKER, et al. 2017), ovinos (READER, et al., 2015; MISHRA et al., 2016), suínos (SOMFAI, et al., 2011), camundongos (MOAWAD, et al., 2014; ZARE, et al., 2015; KHANMOHAMMADI et al., 2016), camelos (FATHI E EL-SHAHAT, 2017), e búfalos (PHONGNIMITR et al., 2013b). No entanto, seu papel nos meios de maturação durante o desenvolvimento de embriões não está totalmente esclarecido.

Sabe-se que a L-carnitina é um co-fator essencial para a entrada de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria. A suplementação do meio de maturação com L-carnitina aumenta os níveis de β -oxidação em folículos cultivados *in vitro* de camudongo (DUNNING et al., 2010, 2011). Este aumento de β -oxidação foi associado com melhora na qualidade dos oócitos, como demonstrado pela capacidade dos oócitos fertilizados para alcançar o estágio de desenvolvimento do blastocisto (DUNNING et al., 2010, 2011). Outros estudos demonstraram efeito benéfico da L-carnitina na maturação e na competência dos oócitos durante MIV em suínos, os quais possuem altos teores de lipídeos intracelulares (HASHIMOTO 2009; SOMFAI et al., 2011; WU et al., 2011; YOU et al., 2012).

Em bubalinos, há descrição do uso de L-carnitina durante a MIV na concentração de 0,3 mg/mL, em que promoveu melhores na taxa de maturação (metáfase II) dos oócitos (PHONGMITR et al., 2013b). Porém, os autores não avaliaram os efeitos da amina no decorrer do desenvolvimento embrionário.

A suplementação com L-carnitina está associada à redistribuição da gota lipídica intracelular em oócitos bovinos (CHANKITISAKUL et al., 2013), à redução nos teores de lipídeos intracelulares em oócitos suínos (SOMFAI et al., 2011) e ao aumento significativo na atividade mitocondrial do oócito em camundongos (WU et al., 2012), bovinos (HASHIMOTO, 2009) e suínos (SOMFAI et al., 2011). Além disso, há relato de que a L-carnitina, na ausência de outros substratos energéticos, melhora o desenvolvimento de embriões pré-implantados em camundongos (DUNNING et al., 2010) e bovinos (SUTTON-MCDOWALL et al., 2012), indicando que a L-carnitina estimula o metabolismo das gotas lipídicas intracelulares. Entretanto, existem estudos que têm demonstrado baixa influência da L-carnitina nos meios de maturação em suínos (YOU et al., 2012) e ovinos (MISHRA et al., 2016) sobre o potencial de desenvolvimento.

Em bovinos, a adição de 2,5 mM de L-carnitina a partir do quarto dia do desenvolvimento proporcionou maior sobrevivência embrionária à vitrificação (LIMA, 2015). Ainda, promoveu melhores taxas desenvolvimento de blastocistos no cultivo de embriões de duas células em camundongos (KHANMOHAMMADI, et al., 2016). Acredita-se que o efeito positivo observado no estágio de cultivo provavelmente se deva ao fato de haver melhoria do metabolismo de lipídeos mitocondriais e, principalmente, pela atuação da L-carnitina como antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo (ABDELRAZIK et al, 2009; DUNNING et al., 2011).

Em oócitos bovinos, foram utilizados 0,6 mg/mL (3.03 mM) durante 21 horas e não houve interferência na taxa de maturação (metáfase II) (CHANKITISAKUL et al., 2013). Em ovinos, foram avaliadas diferentes concentrações de L-carnitina (0, 2.5, 5, 7.5 e 10 mM) durante a MIV e se observou que somente nos grupos tratados com 10 mM houve melhoria nas taxas de clivagem, mórulas e blastocistos (MISHRA et al., 2016).

Em murinos, Dunning et al. (2010) estudaram a β -oxidação durante a MIV em meios suplementados com SFB e BSA. Os autores observaram que apenas no grupo com SFB ocorria aumento dos níveis de oxidação no decorrer da

maturação. Indicaram como provável causa desse efeito a presença de L-carnitina no SFB e ausência da mesma na BSA. Em ambos os casos, tanto nos oócitos maturados em BSA como nos maturados em SFB, a adição de L-carnitina aumentou a oxidação lipídica e melhorou o desenvolvimento de embriões, mostrando a importância da presença desse composto no metabolismo embrionário.

Referências

AARDEMA H.; VOS, P. L.; LOLICATO, F.; ROELEN B. A.; KNIJN H. M.; VAANDRAGER A. B.; HELMS J. B.; GADELLA, B. M. Oleic acid prevents detrimental effects of saturated fatty acids on bovine oocyte developmental competence. **Biology of Reproduction**, v. 85, p. 62-69, 2011.

ABE, H.; YAMASHITA, S.; ITOH, T.; SATOH, T.; HOSHI, H. Ultrastructure of bovine embryos developed from *in vitro* matured and fertilized oocytes: comparative morphological evaluation of embryos cultured either in serum free medium or in serum supplemented medium. **Molecular Reproduction Development**, v. 53, p. 325-335, 1999.

ABE H.; HOSHI, H. Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. **Journal of Reproduction Development**, v. 49, p. 193-202, 2003.

ABDELRAZIK, H.; SHARMA, R.; MAHFOUZ, R.; AGARWAL, A. **L-carnitine decreases DNA damage and improves the *in vitro* blastocyst development rate in mouse embryos.** **Fertility and Sterility**, v. 91, p. 589-596, 2009.

AMBRUOSI, B.; LACALANDRA, G. M.; IORGA A. I.; DE SANTIS, T.; MUGNIER, S.; MATARRESE, R.; GOUDET, G.; DELL'AQUILA, M. E. Cytoplasmic lipid droplets and mitochondrial distribution in equine oocytes: implications on oocyte maturation, fertilization and developmental competence after ICSI. **Theriogenology**, v. 71, p. 1093-1104, 2009.

ANAND, T.; KUMAR, D.; CHAUHAN, M. S.; MANIK, R. S.; PALTA, P. Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation medium, *in vitro* culture medium or both media promotes *in vitro* development of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 20, p. 253-257, 2008.

ANDRIGHETTO, C.; JORGE, A. M.; PICCININ, A. Efeitos da monensina sódica sobre a produção e composição do leite, a produção de mozzarella e o escore de condição corporal de búfalas murrah. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.34, n.2, p.641-649, 2005.

ANGUITA, B.; PARAMIO, M. T.; JIMENEZ-MACEDO, A. R.; MORATÓ, R.; MOGAS, T.; IZQUIERDO, D. Total RNA and protein content, Cyclin B1 expression and developmental competence of prepubertal goat oocytes. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 290-303, 2008.

APARICIO B.; CRUZ M.; MESEGUER M. Is morphokinetic analysis the answer? *Reproductive Biomedicine Online*, v. 27, p. 654-663, 2013.

BONI, R.; SANGELLA L.; DALE, B.; ROVELLO, S.; DI PALO R.; BARBIERI, V. Maturazione *in vitro* di oociti bufalini: indagine ultrastrutturale. **Acta Medica Veterinaria**, v. 38, p. 153-61, 1992.

CHANKITISAKUL, V.; SOMFAI, T.; INABA, Y.; TECHAKUMPHU, M.; NAGAI, T. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine *in vitro* matured oocytes. **Theriogenology**, v. 79, p. 590-598, 2013.

CHEN, J.; HUDSON, E.; CHI, M. M.; CHANG, A. S.; MOLEY, K. H.; HARDIE, D. G.; DOWNS, S. M. AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption in vitro. **Developmental Biology**, v. 291, p. 227-238, 2006.

DEL COLLADO, M.; SARAIVA N. Z.; LOPES F. L.; CRUZ, M. H.; GASPAR, R.C.; OLIVEIRA C. S.; PERECIN F.; GARCIA J. M. Efeitos da redução ou substituição

do soro fetal bovino por outros compostos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, p. 689-694, 2014.

DEL COLLADO, M.; SARAIVA, N. Z.; LOPES, F. L.; GASPAR, R. C.; PADILHA, L.C.; COSTA, R. R.; ROSSI G. F.; VANTINI, R.; GARCIA, J. M. Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. **Reproduction, Fertility and Development**, 28, 1721-1732, 2015.

DI FRANCESCO, S.; BOCCIA, L.; CAMPANILE, G.; DI PALO, R.; VECCHIO, D.; NEGLIA, G.; ZICARELLI, L.; GASPARRINI, B. The effect of season on oocyte quality and developmental competence in Italian Mediterranean buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v.123, p.48-53, 2011.

DOWNS, S. M.; MOSEY, J. L.; AND KLINGER, J. Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, p. 844-853, 2009.

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. **Biology and Reproduction**, v. 83, p. 909-918, 2010.

DUNNING, K.R.; ROBKER, L.R. Promoting lipid utilization with L-carnitine to improve oocyte quality. **Animal Reproduction Science**, v. 134, p. 69-75, 2012.

DUNNING K, R.; RUSSELL D. L.; ROBKER R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and beta-oxidation. **Reproduction**, v. 148: p 15-27. 2014.

DUQUE, P.; HIDALGO, C. O.; GOMEZ, E.; PINTADO, B.; FACAL, N.; DIEZ, C. Macromolecular source as dependent on osmotic pressure and water source:

effects on bovine *in vitro* embryo development and quality. **Reproduction Nutrition Development**, v. 43, p. 487-496, 2003.

DUVNJAK, M.; LEROTI, I.; BARSIC, N.; TOMASIC, V.; VIROVIC JUKIC, L.; VELAGIC, V. Pathogenesis and management issues for nonalcoholic fatty liver disease. **World Journal os Gastroenterology**, v.13, p. 4539-4550, 2007.

EDWARDS, J. L.; HANSEN, P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p.138-45,1997.

EL-NABY, A. S. A. H. H.; MAHMOUD, K. G. H. M.; AHMED, Y. F.; ABOUEL-ROOS, M. E. A.; ABDEL-GHAFFAR, A. E. effect of season of the year and ovarian structures on oocytes recovery rate, quality and meiotic competence in egyptian buffaloes. **Global Veterinaria**, v.10, n.4, p.408-412, 2013.

FATHI M.; EL-SHAHAT K. H. L-carnitine enhances oocyte maturation and improves *in vitro* development of embryos in dromedary camels (*Camelus dromedaries*). **Theriogenology** , v. 104, p. 18-22, 2017.

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

FEUGANG, J. M.; CAMARGO-RODRIGUEZ, O.; MEMILI, E. Culture systems for bovine embryos. **Livestock Science**, v. 121 p. 141-149, 2009.

FU, Q.; LIU, Z. F.; HUANG, Y. L.; LU, Y.Q.; ZHANG, M. comparative proteomic analysis of mature and immature oocytes of swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). **International Journal Molecular Sciences**, v.17, p.1-10, 2016.

GARCIA, A. R. Influência de fatores ambientais sobre as características reprodutivas de búfalos do rio (*Bubalus bubalis*). **Revista de Ciências Agrárias**, n 45, p.1-13, 2006. Suplemento.

GASPARRINI, B. *In vitro* embryo Production in buffalo specie: state of the ART. 2002. **Theriogenology**, v. 57, p. 237-256, 2002.

GASPARRINI, B.; BOCCIA, L.; MARCHANDISE, J.; DI PALO, R.; GEORGE, F.; DONNAY, L.; ZICARELLI, L. Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte with thiol compounds: effect of cysteine on glutathione synthesis and embryo development. **Theriogenology**, v.66, p.275–287, 2006.

GASPARRINI, B. *In vitro* embryo production in buffalo: current situation and future perspectives. **Italian Journal Animal Science**, v.6 (Suppl. 2), p. 92-101, 2007.

GASPARRINI, B.; DE ROSA, A.; ATTANASIO, L.; BOCCIA, L.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; ZICARELLI, L. Influence of the duration of *in vitro* maturation and gamete co-incubation on the efficiency of *in vitro* embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). **Animal Reproduction Science**, v.105, p. 354-364, 2008.

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, p. 238-250, 2014.

GÓMEZ, E.; RODRIGUEZ, A.; MUÑOZ, M.; CAAMAÑO, J. N.; HIDALGO, C. O.; MORÁN, E.; FACAL, N.; DIEZ, C. Serum free embryo culture medium improves *in vitro* survival of bovine blastocysts to vitrification. **Theriogenology**, v. 69, p.1013-1021, 2008.

GONZÁLEZ-SERRANO, AF.; PIRRO, V.; FERREIRA, C. R.; OLIVERI, P.; EBERLIN, L. S.; HEINZMANN, J.; LUCAS-HAHN, A.; NEIMANN, H.; COOKS R.

G. Desorption electrospray ionization mass spectrometry reveals lipid metabolism of individual oocytes and embryos. PLoS ONE, 8:e74981. 2013. Disponível em: < <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074981> >.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.33, p.82-84, 2009.

HASHIMOTO, S. Application of in vitro maturation to assisted reproductive technology. **Journal of Reproduction Development**, v. 55, p. 1–10, 2009.

HELD-HOELKER, E.; KLEIN, S.L.; RINGS, F.; SALILEW-WONDIM, D.; SAEED-ZIDANE, M.; NEUHOFF, C.; TESFAYE, D.; SCHELLANDER, K.; HOELKER, M. Cryosurvival of *in vitro* produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. **Theriogenology**, v. 96, p. 145-152, 2017.

KERNER, J.; HOPPEL, C. Generic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. **Annual Review Nutrition**, v. 18, p.179-206. 1998.

KIM, N. H. The distribution and requirements of microtubules and mecrofilaments in bovine oocytes during *in vitro* maturation. **Zygote**, v.8, p.25-32, 2000.

KIM, J. Y; KINOSHITA, M.; OHNISHI, M.; FUKUI, Y. Lipid and fatty acid analysis of fresh and frozen–thawed immature and *in vitro* matured bovine oocytes. **Reproduction**, v. 122, p. 131–138. 2001.

KNITLOVA, D.; HULINSKA, P.; JESETA, M.; HANZALOVA, K.; KEMPISTY, B.; MACHATKOVA, M. Supplementation of L-carnitine during *in vitro* maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 102, p. 16-22, 2017.

KHAKI, A.; BATAVANI, R.; NAJAFI, G.; TAHMASBIAN, H.; BELBASI, A.; MOKARIZADEH, A. Effect of leptin on *in vitro* nuclear maturation and apoptosis of

buffalo (*Bubalus bubalis*) oocyte. **International Journal of Fertility & Sterility**, v.8, p.43-50, 2014.

KHANMOHAMMADI, N.; MOVAHEDIN, M.; SAFARI, M.; SAMENI, H. M.; BEHPOUR YOUSEFI, B.; JAFARI, B.; ZARBAKHS, S.; ZARBAKHS, S. Effect of L-carnitine on *in vitro* developmental rate, the zona pellucida and hatching of blastocysts and their cell numbers in mouse embryos. **International Journal of Reproductive BioMedicine**, v. 14. p. 649-656, 2016.

LIM, K. T.; JANG, G.; KO, K. H.; LEE, W. W.; PARK, H. J.; KIM, J. J.; KANG, S. K.; LEE, B. C. Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. **Animal Reproduction Science.**, v. 103, p. 239-48, 2008.

LIMA, M. R. **Efeitos de reguladores do metabolismo lipídico no desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos e na sobrevivência à vitrificação.** Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2015.

LOURENÇO JUNIOR, J. B.; GARCIA, A. R. Produção animal no bioma Amazônico: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, p. 63-83, 2006.

MAHMOUD, G. M.; NAWITO, M. F. Cytogenetic evaluation of *in vitro* matured buffalo oocytes in different culture condition. **Egyptian Journal Veterinary Science**, v. 37, p. 105-116, 2003.

MCEVOY, T.G.; COULL, G. D.; BROADBENT, P. J.; HUTCHINSON, J. S. M.; SPEAKE, B. K. Fatty acid composition of lipids in immature cattle, pig and sheep oocytes with intact zona pellucida. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 118, p. 163–170, 2000.

MILAZZOTTO, M. P.; GOISSIS, M. D.; CHITWOOD, J. L.; ANNES, K.; SOARES, C. A.; ISPADA, J.; ASSUMPCAO, O. A.; ELENA, M.; ROSS, P. J. Early cleavages influence the molecular and the metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. **Molecular Reproduction and Development**, v. 83, n. 4, p. 324-336, 2016.

MINGOTI, G. Z.; CASTRO, V. S. D. C.; MÉO, S. C.; BARRETO, L. S. S.; GARCIA, J. M. The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine *in vitro* procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. **In vitro Cellular & Developmental Biology Animal**, vol. 47, p. 361-367. 2011.

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, p. 279–290, 2011.

MISHRA, A.; REDDY, I. J.; GUPTA, P. S. P.; MONDAL, S. L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced *in vitro*. **Reproduction Domestic Animals**, 51, 311-321, 2016.

MONDADORI, R. G.; SANTIN, T. R.; FIDELIS, A. A. G.; NAME, K. P. O.; SILVA, J. S.; RUMPF, R.; BÁO, S. N. Ultrastructure of *in vitro* oocyte maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*). **Zygote**, v.18, p.309–314, 2010.

MONTI, M.; ZANONI, M.; CALLIGARO, A.; KO, M. S.; MAURI, P.; REDI, C. A. Developmental arrest and mouse antral not-surrounded nucleolus oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 88, p. 1-7, 2013.

MOAWAD, A. R.; XU, B.; TAN, S. L.; TAKETO, T. L-carnitine supplementation during vitrification of mouse germinal vesicle stage-oocytes and their subsequent *in vitro* maturation improves meiotic spindle configuration and mitochondrial

distribution in metaphase II oocytes. **Human Reproduction**, v. 29 p. 2256-2268, 2014.

NANDI, S.; RAGHU, H. M.; RAVINDRANATHA, B. M.; CHAUHAN, M. S. Production of buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos *in vitro*: premises and promises. **Reproduction Domestic Animals**, v. 37, p. 65-74, 2002.

NEGLIA, G.; MARINO, M.; DI PALO, R.; WILDING, M.; CARACCIOLO DI BRIENZA, V.; DALE, B.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L. A comparison of *in vitro* maturation in buffalo (*Bubalus bubalis*) and bovine oocytes using confocal microscopy. **Theriogenology**, v. 55, p.488, 2001.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; CARACCIOLO DI BRIENZA, V.; DI PALO, R.; CAMPANILE, G.; PRESICCE, G. A.; ZICARELLI, L. Bovine and buffalo *in vitro* embryo production using oocytes derived from abattoir ovaries or collected by transvaginal follicle aspiration. **Theriogenology**, v. 59, n.11, p. 23-30, 2003.

NEGLIA, G.; GASPARRINI, B.; VECCHIO, D.; BOCCIA, L.; VARRICCHIO, E.; DI PALO, R.; ZICARELLI, L.; CAMPANILE, G. Long term effect of Ovum Pick-up in buffalo species. **Animal Reproduction Science**, v. 123, p.180-186, 2011.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6a ed. Porto Alegre, Ed. Arned, 2014.

PARAMIO, M. T. *In vivo* and *in vitro* embryo production in goats. **Small Ruminant Research**, v. 89, p.144-148, 2010.

PAYTON, R. R.; LAWRENCE, J. L.; SAXTON, A. M.; DUNLAP, J. R.; EDWARDS, J. L. Cortical granule types and nuclear stage of bovine oocytes after exposure to elevated temperature during maturation. **Theriogenology**, v.59, p. 496, 2003.

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 p. 719-725, 2013a.

PHONGNIMITR, T.; LIANG, Y.; SRIRATTANA, K.; PANYAWAI, K.; SRIPUNYA, N.; TREETAMPINICH, C.; PARNPAI, R. Effects of l-carnitine supplemented in maturation medium on the maturation rate of swamp buffalo oocytes. **Buffalo Bulletin**, v. 32, p. 613-616, 2013b.

PURI, G.; CHAUDHARY, S. S.; SINGH, V. K.; SHARMA, A. K. Effects of fetal bovine serum and estrus buffalo serum on maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes *in vitro*. **Veterinary World**, v. 8, p. 143-146, 2015.

PUROHIT, G.N.; BRADY, M.S. ; SHARMA, S. S. Influence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor 1 on nuclear maturation and fertilization of buffalo cumulus oocyte complexes in serum free media and their subsequent development *in vitro*. **Animal Reproduction Science**, v. 87, p. 229-239, 2005.

READER, K. L.; COX, N. R.; STANTON, J. A. L.; JUENGEL, J. L. **Effects of acetyl-L-carnitine on lamb oocyte blastocyst rate, ultrastructure, and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology*, 83, p.1484-1492, 2015.**

RIZOS, D.; GUTIERREZ-ADAN, A.; PEREZ-GARNELO, S.; DE LA FUENTE, J.; BOLAND, M. P.; LONERGAN, P. Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 236-243, 2003.

ROCHA-FRIGONI, N. A. S.; LEÃO, B. C. S.; 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, p.1-9, 2016.

ROMEK, M.; GAJDA, B.; KRZYSZTOFOWICZ, E.; KEPCZYNSKI, M.; SMORAG, Z. New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine

oocytes and pre-implantation embryos using Nile Red fluorescent probe. **Theriogenology**, v. 75, p.42-54, 2010.

RUDERMAN, N.B.; SAHA, A.K.; KRAEGEN, E.W.. Minireview: Malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. **Endocrinology**, v. 144, p.5166–5517, 2003.

SÁ FILHO, M. F.; CARVALHO, N. A. T.; GIMENES, L. U.; TORRES-JÚNIOR, J. R.; NASSER, L. F.; TONHATI, H.; GARCIA, J. M.; GASPARRINI, B.; ZICARELLI, L.; BARUSELLI, P. S. Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on *in vitro* buffalo embryo production. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 51-59, 2009.

SINGHAL, S.; PRASAD, S.; SINGH, B.; PRASAD, J.K.; GUPTA, H.P. Effect of including growth factors and antioxidants in maturation medium used for *in vitro* culture of buffalo oocytes recovered in vivo. **Animal Reproduction Science**, v. 113, p. 44-50, 2009.

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.

SPRICIGO, J. F.; MORATO, R.; ARCARONS, N.; YESTE, M.; DODE, M. A.; LOPEZ-BEJAR, M. MOGAS,T. **Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on *in vitro*-matured calf oocytes.** **Theriogenology**, v. 89, p. 47-57, 2017.

STURMEY, R. G.; O'TOOLE, P. J.; LEESE, H. J. Fluorescence resonance energy transfer analysis of mitochondrial: lipid association in the porcine oocyte, **Reproduction**, v. 132, p. 829–837, 2006.

SU, Y. Q.; SUGIURA, K.; WIGGLESWORTH, K.; O'BRIEN, M. J.; AFFOURTIT, J. P.; PANGAS S. A.; MATZUK, M. M.; EPPIG, J. J. Oocyte regulation of metabolic cooperativity between mouse cumulus cells and oocytes: BMP15 and GDF9 control cholesterol biosynthesis in cumulus cells. **Development**, v. 135 p. 111-121, 2008.

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 pre-implantation embryos. **Theriogenology**, v. 77, p. 1632–1641, 2012.

THIELE C.; SPANDL, J. Cell biology of lipid droplets, **Current Opinion in Cell Biology**, v. 20, n. 4, p. 378–385, 2008.

YAMADA, T.; IMAI, H.; YAMADA, M. Beneficial effects of acetyl-L-carnitine treatment during IVM on post-fertilization development of bovine oocytes *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 18, p. 280-281, 2006.

YANG, X.; DUNNING, K. R.; WU, L. L-Y.; HICKEY, T. E.; NORMAN, R. J.; RUSSEL, D. L.; LIANG, X.; ROBKER, R. L. Identification of Perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. **Reproduction, Fertility and Development**, v.22, p.1262-1271, 2010.

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. 235-43, 2012.

YOUSAF, M. R.; CHOCHAN, K. R. Nuclear morphology, diameter and meiotic competence of buffalo oocytes relative to follicle size. **Reproduction, Fertility and Development**, n.15, p.223–229, 2003.

WALTHER T. C.; FARESE Jr.; R. V. The life of lipid droplets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1791, p. 459–466, 2009.

WANG, Q.; SUN, Q.Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, no. 1, p. 1–12, 2007.

WANI, A. R.; KHAN, M. Z.; SOFI, K. A.; LONE, F. A.; MALIK, A. A.; BHAT, F. A. Effect of cysteamine and epidermal growth factor (EGF) supplementation in maturation medium on *in vitro* maturation, fertilization and culturing of embryos in sheep. **Small Ruminant Research**, v. 106, p.160-164, 2012.

WRENZYCKI, C.; HERRMANN, D.; NIEMANN, H. Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo vitality. **Theriogenology**, v.68, p.77-83, 2007.

WU, X. Q.; ZHANG, X.; LI, X.H.; CHENG, H. H.; KUAI, Y. R.; WANG, S.; GUO, Y. L. Translocation of classical PKC and cortical granule exocytosis of human oocyte in germinal vesicle and metaphase II stage. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, p. 1353–1358, 2006.

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.

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 Genetics**, v. 32, p. 635-643, 2015.

ZHANG, W.; YI, K.; YAN, H.; ZHOU, X. Advances on *in vitro* production and cryopreservation of porcine embryos. **Animal Reproduction Science**, v.132, p. 115-122, 2012.

CAPÍTULO 2 – É POSSÍVEL ALTERAR O ACÚMULO LIPÍDICO EMBRIONÁRIO COM REDUÇÃO DO SFB E USO DE L-CARNITINA NA MATURAÇÃO *IN VITRO* DE OÓCITOS BUBALINOS?

Trabalho a ser submetido à revista “Zygote”

Resumo

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é um procedimento que pode promover melhoria genética em curto intervalo de tempo. No entanto, as taxas obtidas com o uso dessa biotécnica na espécie bubalina ainda são inconsistentes, o que pode estar associado à elevada concentração de lipídeos presentes no citoplasma dos oócitos e embriões. O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos da redução da concentração de SFB e/ou uso da L-carnitina na MIV sobre o desenvolvimento pré-implantacional e acúmulo lipídico nos embriões bubalinos. No experimento I, foi determinado a menor concentração de SFB no meio MIV (0%, 2,5%, 5% ou 10%) que promovesse manutenção das taxas de desenvolvimento embrionário, onde verifico-se que a menor concentração efetiva foi de 5% de SFB. No experimento II, foi avaliado a adição de 5 mM de L-carnitina nos meios de maturação. Os blastocistos produzidos foram submetidos à avaliação lipídica, por meio de técnicas de coloração em microscopia óptica e confocal. Não foi observado diferença entre os grupos 5% de SFB e 10% SFB, sendo que os mesmos foram superiores aos grupos 0% e 2,5% de SFB. Ainda, os tratamentos com 5% e 10% de SFB, foram superiores aos grupos suplementados com L-carnitina. Não houve diferenças em relação ao acúmulo lipídico embrionário. Foi concluído a partir deste estudo que é possível reduzir a concentração de SFB até 5% nos meios de maturação *in vitro* para produção de embriões em bubalinos e a suplementação do meio com L-carnitina não proporciona aumento na produção embrionária.

Palavras chave.

Desenvolvimento embrionário, búfalos, lipídios neutros, soro fetal bovino, modulador de metabolismo lipídico.

CHAPTER 2 – IS IT POSSIBLE TO ALTER THE EMBRYO LIPID ACCUMULATION WITH REDUCTION OF FBS AND USE OF L-CARNITINE FOR *IN VITRO* MATURATION OF BUBALINE OOCYTES?

Abstract

In vitro embryo production (IVEP) is a procedure that can promote genetic improvement in a short time frame. However, the success rates obtained with this biotechnology in water buffaloes are still inconsistent, which can be associated with the high concentration of lipids in the cytoplasm of oocytes and embryos. The objective of this study was to evaluate the effects of reduced concentration of fetal bovine serum (FBS) and/or use of L-carnitine during *in vitro* maturation (IVM) on the pre-implantation development and lipid accumulation in bubaline embryos. In experiment I, the lowest concentration of FBS in the IVM medium (0%, 2.5%, 5% or 10%) was determined while still maintaining good embryo development rates, where it was found that the lowest effective concentration was 5%. In experiment II, the addition of 5 mM of L-carnitine in the maturation medium was evaluated. The blastocysts produced were submitted to lipid evaluation by means of staining and examination by optical and confocal microscopy. No difference was observed between the 5% and 10% FBS groups, which were superior to the 0% and 2.5% groups. Furthermore, the performance of the groups treated with 5% and 10% FBS was better than the groups supplemented with L-carnitine. There was no difference regarding embryo lipid accumulation. The results indicate that it is possible to reduce the FBS concentration to 5% in *in vitro* maturation media for production of bubaline embryos, and supplementation with L-carnitine does not increase embryo production.

Keywords.

Embryo development, buffaloes, neutral lipids, fetal bovine serum, lipid metabolism modulator.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em bubalinos tem apresentado algumas limitações, sendo relatadas taxas de blastocistos entre 9,5 e 30%, resultados inferiores à média normalmente observada em bovinos, que gira em torno de 30 a 45% (Gasparrini, 2002; Ferraz et al., 2005; Sá Filho et al., 2009). Apesar da eficiência da PIVE ter aumentado nos últimos anos em búfalos, a taxa de clivagem ainda é baixa quando comparada a de outras espécies domésticas (Gasparrini et al., 2008). Estes resultados podem estar ligados à elevada concentração de lipídeos presentes no citoplasma dos oócitos e embriões desta espécie (Gasparrini, 2002).

O soro fetal bovino (SFB), suplemento proteico normalmente utilizado na PIVE, é um composto que possui uma variedade de substâncias, componentes na maior parte indefinidos, incluindo ácidos graxos, fatores de crescimento, substratos energéticos, aminoácidos e vitaminas, sendo bastante utilizado nos meios de cultura, por promover o aumento nas taxas de produção *in vitro* de embriões bovinos (Ali & Sirard, 2002). No entanto, este composto pode ocasionar alterações na ultraestrutura, compactação e blastulação embrionária, assim como alteração na expressão de RNAm, aumentando a incidência de natimortos e mortalidade após o nascimento (Abe & Hoshi, 2003). Outros fatores negativos relacionados ao SFB são o acúmulo lipídico, aumento da concentração de ácidos graxos e gotas lipídicas citoplasmáticas nos blastocistos e diminuição da criotolerância embrionária (Rizos et al., 2003; Leivas et al., 2011).

Dessa forma, nos últimos anos foram testados alguns substitutos para o SFB, como a polivinilpirrolidona (PVP), o álcool polivinílico (PVA) e o substituto sintético de soro (SSS), tanto na maturação *in vitro* (MIV) de oócitos quanto no cultivo *in vitro* (CIV) de embriões bovinos (Ali & Sirard, 2002; Lim et al., 2008; Sayirkava et al., 2007). No entanto, em bubalinos os efeitos da redução do SFB na PIVE ainda são desconhecidos.

Em consonância à busca pela redução do acúmulo lipídico, em estudos recentes com embriões bovinos, foi avaliado o uso de reguladores do metabolismo lipídico no decorrer da PIVE, sendo que os mesmos concluíram que a adição dessas substâncias aos meios de cultura pode influenciar a expressão

de genes reguladores do metabolismo lipídico e melhorar a competência de desenvolvimento e qualidade embrionária (Ghanem, et al., 2014; Spricigo et al., 2017).

Nesse contexto, a L-carnitina (3-hidroxi-4-N-trimetilamino-butilato), uma amina quaternária com função fundamental na geração de energia pela célula, vem sendo bastante estudada, pois age nas reações transferidoras de ácidos graxos livres de cadeia longa do citosol para mitocôndrias, facilitando sua oxidação e geração de adenosina trifosfato (ATP). Embora efeitos positivos da L-carnitina em oócitos e embriões tenham sido descritos em bovinos (Yamada et al., 2006; Chankitisakul et al., 2013; Phongnimitr et al., 2013a; Knitlova et al., 2017; Spricigo et al., 2017; Held-Hoelker et al. 2017), ovinos (Reader, et al., 2015; Mishra et al., 2016), suínos (Somfai et al., 2011), camundongos (Moawad et al., 2014; Zare et al., 2015; Khanmohammadi et al., 2016), camelos (Fathi e El-Shahat, 2017), e em búfalos (Phongnimitr et al., 2013b), até o presente momento, não há estudos disponíveis sobre a ação desse composto associado com a redução do SFB na maturação *in vitro* (MIV) sobre a PIVE de embriões bubalinos.

Considerando os impactos potencialmente positivos de estratégias de substituição/redução do SFB no decorrer da PIVE, associados ao uso de reguladores metabólicos que propiciem incrementos no metabolismo lipídico de oócitos e embriões, e a etapa da (MIV) como sendo crítica nesse processo, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da redução da concentração de soro fetal bovino em associação ao uso da L-carnitina na MIV sobre o desenvolvimento e acúmulo lipídico de embriões bubalinos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Local dos experimentos e reagentes

Os experimentos propostos foram conduzidos no Laboratório de Análises de Sistemas Sustentáveis (LASS) da Embrapa Amazônia Oriental, localizado em Belém – PA.

Reagentes e meios de cultivo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA), a menos que indicado de outra forma.

2.2. Delineamento experimental

2.2.1 Experimento I. Efeitos da redução do SFB durante MIV na produção embrionária

Em um primeiro experimento, buscou-se a menor concentração de SFB no meio MIV efetiva na manutenção das taxas de desenvolvimento embrionário obtidas pelo grupo controle (10% SFB). Oócitos bubalinos foram submetidos à MIV em meio suplementado com: 0% (apenas BSA), 2,5%, 5% ou 10% de SFB. Foram avaliadas as taxas de clivagem e de produção de blastocistos.

2.2.2 Experimento II. Efeitos da adição de L-carnitina durante a MIV sobre o desenvolvimento embrionário e acúmulo lipídico

Após definição da menor concentração efetiva, realizou-se um segundo experimento, no qual os grupos 0%, 5% e 10% de SFB também foram avaliados quanto à adição de 5 mM de L-carnitina no meio MIV. Os Blastocistos produzidos neste experimento foram submetidos a ensaios para avaliação da quantificação lipídica, por meio de técnicas de coloração em microscopia óptica (Ensaio com OilRed O) e confocal (coloração com BODIPY 493/503).

2.3. Obtenção de oócitos e de embriões produzidos *in vitro*

2.3.1 Seleção e maturação *in vitro* dos oócitos

Foram utilizados nos experimentos oócitos bubalinos provenientes de ovários de animais abatidos. Os ovários foram colhidos e transportados até o laboratório em até 3 horas, em recipiente isotérmico contendo solução salina estéril e mantidos à temperatura de 30-35°C. Folículos ovarianos medindo entre 3 e 8 mm de diâmetro foram aspirados, utilizando-se agulha 18-G acoplada a seringa descartável de 20 mL, e o fluído aspirado transferido para um tubo de polipropileno de 50 mL. Depois de 15 min. de decantação, o sedimento foi transferido para uma placa de poliestireno e visualizado em microscópio estereoscópico para a procura e seleção dos oócitos. Os oócitos foram classificados em viáveis (com pelo menos uma camada de células do *cumulus* ao

redor do oócito) e não viáveis (atrésicos e desnudos), sendo que apenas oócitos viáveis foram utilizados.

Os oócitos foram lavados em meio TCM-199 tamponado com 5 mM de bicarbonato de sódio e 20 mM de Hepes, suplementado com 5 mg/mL de BSA, 0,20 mM de piruvato sódico e 83,4 µg/mL de amicacina (meio Lavagem).

O meio base utilizado para a maturação *in vitro* (meio MIV) era composto de TCM 199 tamponado com 25 mM de bicarbonato de sódio e suplementado, 1,0 µg/mL de FSH, 50µg/mL de hCG, 1,0 µg/mL de estradiol, 0,20 mM de piruvato sódico, 83,4 µg/mL de amicacina e antioxidantes (Sigma-Aldrich- A1345), sendo os grupos suplementados com 0%, 2,5%, 5,0 ou 10% de SFB, dependendo do experimento. Os oócitos foram cultivados em gotas de 100 µL, grupos de 15-20, recobertas em óleo mineral e mantidos em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar por 22 h. No segundo experimento, as mesmas condições foram utilizadas, porém, houve adição de 5 mM de L-carnitina no meio MIV, com base em relatos da literatura para a espécie bovina.

2.3.2. Produção *in vitro* de embriões

Após a MIV por 22 h, oócitos foram fecundados *in vitro* com sêmen de um único touro em meio TALP-FIV suplementado com 0,6% de BSA, 10 µg/mL de heparina, 18 µM de penicilamina, 10 µM de hipotaurina e 1,8 µM de epinefrina por um período de até 24 h, o sêmen utilizados foi do mesmo touro previamente testado. Em seguida, os prováveis zigotos foram lavados, sendo o cultivo de desenvolvimento realizado em meio SOF modificado suplementado com 1,5% de SFB e 6mg/mL de BSA livre de ácidos graxos. Todas as estruturas foram mantidas em estufa a 38,5°C e atmosfera de 5% de CO₂ em ar durante 6 a 7 dias, para atingirem o estágio de blastocisto (dia 0 = dia da fecundação).

Foram cultivados entre 10 a 20 zigotos por microgota de 100µL, em placas de poliestireno de 35 mm recobertas com óleo mineral. As taxas de clivagem e de produção de blastocistos foram verificadas após 48 h do CIV e 6-7 dias da FIV. Tanto a taxa de clivagem quanto a taxa de blastocistos foram calculadas pelo número total de oócitos viáveis (utilizados na MIV). O meio de desenvolvimento era parcialmente renovado no quarto dia de desenvolvimento embrionário,

removendo-se 50% do meio pré-existente na gota de desenvolvimento e repondo-se igual volume de meio recém-preparado.

2.4. Avaliação do acúmulo lipídico nos embriões produzidos *in vitro*

2.4.1. Ensaio de acúmulo lipídico com microscopia óptica

Parte dos blastocistos produzidos (18 embriões advindos dos 5 grupos: 0% SFB = 3, 5% SFB=6, 10% SFB=3, 5% SFB-LC=3, 10% SFB-LC=3) foram fixados em paraformaldeído 4% e corada com OilRed O, um corante lipossolúvel que evidencia lipídeos neutros, para visualização das gotículas de lipídeos citoplasmáticas em microscópio óptico. As estruturas foram fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 20 min, e em seguida, armazenadas em PBS a 4 °C até a coloração. Para análise das gotas lipídicas, os embriões fixados foram lavados com isopropanol a 60%, sendo em seguida incubados em solução de trabalho contendo o corante Oil Red, conforme especificações do fabricante. Após a coloração, os embriões foram lavados 4 vezes com água destilada e montados em lâminas.

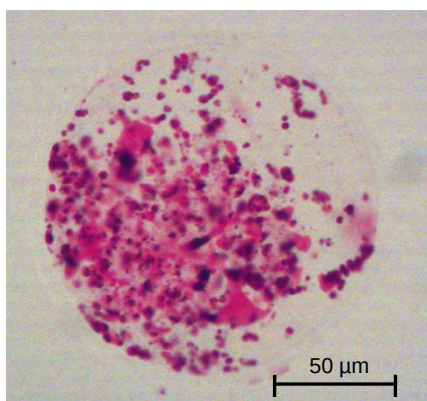


Figura 1. Demonstração de gotas lipídicas (lipídeos neutros) embrionárias após coloração com OilRed O e visualização em microscopia óptica.

As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico invertido (Leica DMLS), e as imagens capturadas com uma câmera Moticam 5.0 MP e armazenadas usando o programa Motic Image Plus 2.0. Em seguida, as imagens foram avaliadas pelo programa ImageJ, estimando-se a quantidade de lipídeos presentes (Figura 1).

2.4.2. Avaliação de acúmulo lipídico em microscopia confocal

Oitenta e sete blastocistos, advindos dos 5 grupos avaliados (0% SFB = 18; 5% SFB = 14; 10% SFB = 20; 5% SFB-LC = 22; 10% SFB-LC = 13) foram fixados em 4% de paraformaldeído por 30 minutos, permeabilizados com 0,1% de saponina em PBS por uma hora e corados com 20 µg/mL de BODIPY 493/503 por 30 minutos para quantificação lipídica em microscopia confocal, mediante marcação com uma sonda específica para lipídeos neutros, BODIPY 493/503 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA), seguindo as instruções do fabricante. Para a visualização das estruturas, foi utilizado excitação 330-385nm e emissão 420-490nm. Para contar o número de células, os embriões foram corados com 10 µg/mL Hoechst 33342 por 20 minutos e posteriormente colocados entre lâmina *fluoromount*.

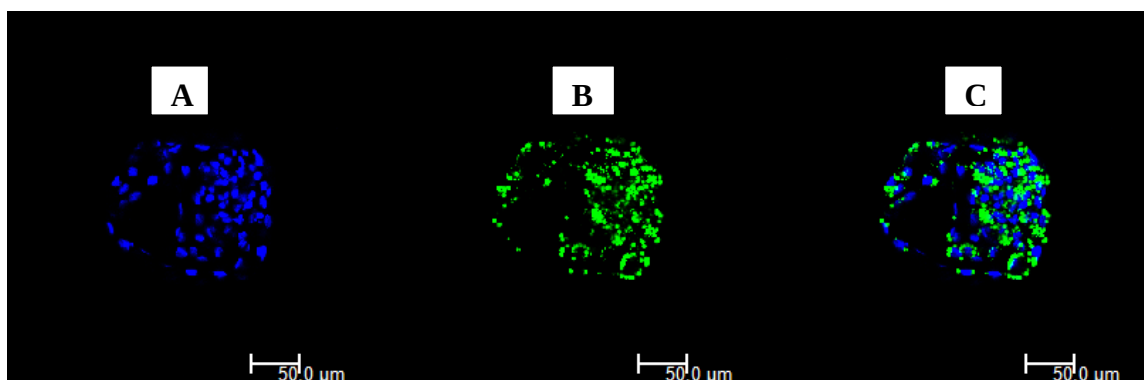


Figura 2. Processamento da imagem original (A= núcleos corado com Hoechst 33342; B= Coloração de lipídios pelo Bodipy 493/503; C= Imagens sobrepostas) para a quantificação lipídica, por meio de microscopia confocal.

Os embriões foram analisados usando o microscópio confocal LSM 710 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) com laser Argônio para visualização das gotas lipídicas, numa resolução de 1024x1024 *pixels* com 12 *bits*, em magnitude de 63X em óleo, com excitação e emissão de 488 e 516 nm, respectivamente. Foi capturada uma imagem por embrião usando a seção de maior diâmetro que, posteriormente, foi analisada no programa ImageJ (Figura 2) . A razão da área das gotas lipídicas/ área total do embrião foi realizada como descrito anteriormente (Del Collado *et al.*, 2015). Para obter a área das gotas lipídicas, foi

utilizada a ferramenta “*nucleus counter*” que permite o cálculo total da área ocupada pelas gotas. Em continuação, foi medida a área do embrião para o cálculo da razão da área das gotas lipídicas pela área do embrião e pelo número de blastômeros.

2.5. Análise estatística

Os dados de produção embrionária foram avaliados por Análise de variância – ANOVA, com o uso de *testes pos hoc* de Tukey. Já os dados relativos à quantificação lipídica, como não apresentaram normalidade, foram avaliados pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis. Foram considerados significativos os valores de P iguais ou inferiores a 0,05. Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SPSS versão 22.0.0.0, com exceção dos dados de avaliação lipídica que, por sua vez, foram avaliados no programa GraphPad Prism 7 versão 7.03.

3. RESULTADOS

No total, 1394 oócitos foram utilizados para avaliar o efeito de diferentes concentrações de SFB e uso da L-carnitina durante a MIV no desenvolvimento *in vitro* de embriões bubalinos.

3.1 Experimento I. Efeitos da redução do SFB durante MIV na produção embrionária

A Tabela 1 mostra os efeitos da redução do SFB durante a MIV na produção de blastocistos, comparando-se a variável SFB nos 4 grupamentos de forma simultânea. Verificou-se que o grupo 10% de SFB não apresentou diferença em comparação ao grupo 5% de SFB. No entanto, ambos foram superiores ($p < 0,05$) em relação os grupos 0% de SFB e 2,5% de SFB que, por sua vez, foram similares entre si.

Tabela 1. Taxa de produção de blastocistos após MIV de oócitos bubalinos em meios contendo diferentes concentrações de SFB.

Grupos	Nº de Oócitos	Nº de Blastocistos	Taxa (%)
SFB 0%	104	11	10.58 ^b
SFB 2,5%	83	16	19.28 ^b
SFB 5%	79	27	34.18 ^a
SFB 10%	150	52	34.67 ^a

Médias com letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA e teste Tukey).

3.2 Experimento II. Efeitos da adição de L-carnitina durante a MIV sobre o desenvolvimento embrionário e acúmulo lipídico

Houve decréscimo das taxas de clivagem apenas no grupo 0% de SFB, que diferiu dos demais (Tabela 2).

Quanto às taxas de produção de blastocistos, houve diminuição no grupo 0% de SFB. Os tratamentos com 5% de SFB e 10% de SFB foram similares entre si, porém, superiores aos grupos suplementados com L- carnitina.

Tabela 2. Desenvolvimento embrionário (taxas de clivagem e de blastocistos) sob diferentes concentrações de SFB, em associação ou não à L-carnitina (LC) durante a MIV de oócitos bubalinos.

Grupos	Nº de Oócitos	Nº de Blastocistos	Taxa (%)
0% de SFB	270	34	12.59 ^c
5% de SFB	184	60	32.61 ^a
10% de SFB	227	82	36.12 ^a
5% de SFB-LC	144	32	22.22 ^b
10% de SFB-LC	153	38	24.84 ^b

^{a,b} letras diferentes na mesma coluna mostram diferença significativa ($P < 0,05$, ANOVA e Tukey).

Os resultados obtidos por meio de microscopia óptica demonstram a quantidade de lipídeos presentes nas estruturas, expressa pelas médias de área total (in^2). O resultado da quantificação lipídica embrionária pela análise de

microscopia confocal foi expresso pela razão de área das gotas lipídicas pela área do embrião e pelo número de blastômeros.

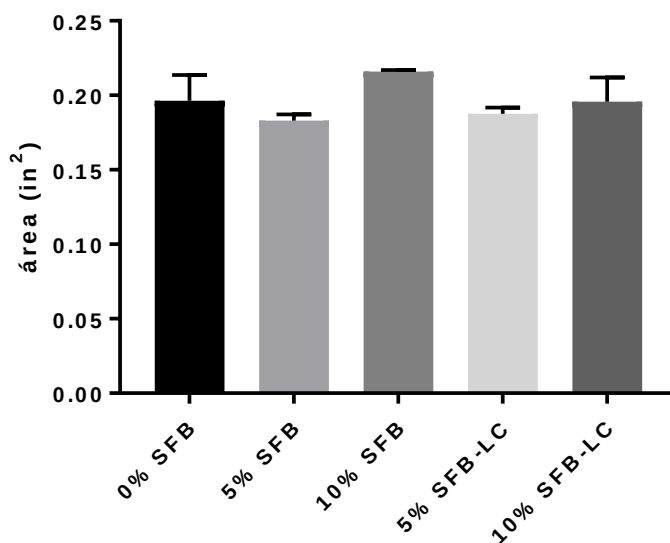


Figura 3. Área total de lipídeos neutros acumulados em embriões bubalinos oriundos de diferentes tratamentos durante a MIV, após coloração com “Oil Red O”. Não houve diferença entre grupos (Kruskal-Wallis Test com valor $P > 0,05$). LC – L-carnitina.

A quantificação de fosfolipídios com coloração com microscopia óptica (Oil Red O), não foi diferente em relação aos demais tratamentos (Figura 3), bem como a quantificação de lipídios neutros (Bodipy) (Figura 4).

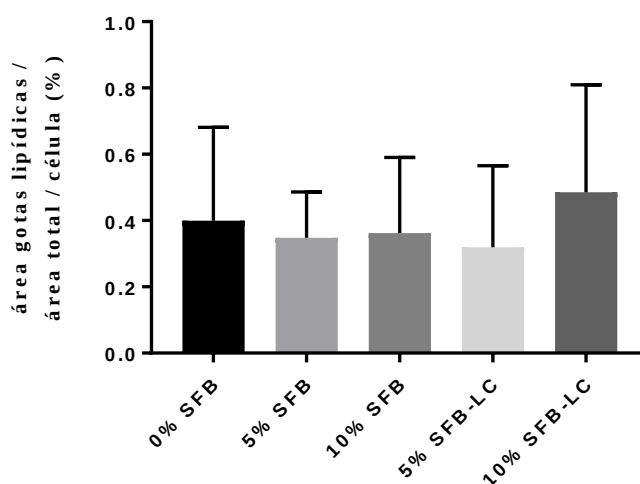


Figura 4. Efeitos do acúmulo de lipídios neutros embrionário após diferentes tratamentos utilizados na MIV. Não houve diferença entre grupos (Kruskal-Wallis Test, $P > 0,05$).

4. DISCUSSÃO

Até o momento, o presente estudo foi o primeiro a avaliar os efeitos da redução da concentração de soro fetal bovino em associação ao uso da L-carnitina na MIV sobre o desenvolvimento e composição lipídica de embriões bubalinos.

Em relação à presença do SFB nas taxa de desenvolvimento embrionário, diversos autores têm demonstrado seu papel nas diferentes fases da PIVE (Rizos et al., 2003; Leivas et al.; 2011; Del Collado et al., 2015). Visando a redução do acúmulo lipídico na MIV, nossos resultados mostram que a concentração de SFB no meio de MIV pode ser reduzida pela metade (de 10% para 5% de SFB), sem que as taxas de desenvolvimento embrionário até blastocistos sejam afetadas. No entanto, concentrações inferiores (0% e 2,5% de SFB) levaram à diminuição nas taxas de desenvolvimento embrionário.

Vários estudos têm sido realizados com o intuito de remover o SFB nos sistemas de cultivo, por meio da sua substituição, ou mesmo da redução de sua concentração (Feugang et al., 2009), visando o uso de meios definidos (Lim et al., 2007; Mingoti et al., 2011). Del Collado et al. (2014) utilizaram albumina sérica bovina livre de ácidos graxos (BSA-FAF) e um produto comercial denominado fluido embriônico (FE), de maneira isolada e em diferentes combinações e concentrações, e concluíram que é possível reduzir a concentração de SFB no meio de MIV de bovinos em até 3,5%, sem prejuízo significativo aos índices de maturação nuclear e citoplasmática.

Um dos mecanismos que explica a importância dos lipídeos nos eventos durante a maturação nuclear está na relação entre a β -oxidação e a reativação da meiose (Downs et al., 2009; Dunning et al., 2010). Tal mecanismo ocorre por meio da ativação da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), a qual promove quebra da vesícula germinativa e reativação da meiose (Chen et al., 2006). Neste evento, a acetil-CoA carboxilase (ACC) é a principal responsável pela ativação da MAPK (Downs et al., 2009). Apesar de ser a oxidação dos ácidos graxos uma das maiores consequências da ativação da MAPK, pela diminuição dos níveis do malonil-CoA. Estudos demonstraram que a inibição da oxidação dos lipídeos

impede, por sua vez, a reativação da meiose (Downs et al., 2009 e Dunning et al., 2010).

Del Collado et al. (2015) relataram que meios utilizados na MIV, contendo SFB em alta concentração (10%), aumentam o conteúdo de lipídeos totais em 18 vezes, resultando em maior acúmulo de lipídeos em oócitos bovinos, quando se compara ao uso de meios contendo apenas BSA. Pelo fato do SFB possuir componentes que levam ao acúmulo lipídico, meios suplementados com esse composto podem resultar em embriões sensíveis à criopreservação. Além disso, o SFB pode provocar danos na membrana mitocondrial e alteração na expressão de genes importantes para o correto desenvolvimento embrionário (Rizos et al., 2003; Wrenzycki et al., 2007).

No presente estudo, foi avaliado o comportamento em relação ao acúmulo lipídico e se verificou que mesmo reduzindo as concentrações de SFB na MIV, não foi constatada diferença entre os grupos estudados. Ainda existem controvérsias sobre o comportamento dos lipídeos durante a MIV nas diferentes espécies, sendo observado, por exemplo, diminuição do acúmulo na espécie suína (Romek et al., 2010) e aumento na murina (Yang et al., 2010). De acordo com os achados do presente estudo, não houve redução no acúmulo lipídico em embriões bubalinos produzidos *in vitro* independentemente da concentração de SFB no meio MIV e da presença da L-carnitina.

A possível ação prejudicial da alta concentração de SFB, verificada em alguns estudos, pode ser em decorrência do fato do soro ser um composto rico em ácidos graxos e, sabendo-se da capacidade destes de serem transportados até o citoplasma oocitário, seria esperado o aumento de lipídeos nos oócitos (Del Collado et al., 2014). Tal fato pode ser prejudicial para embriões bubalinos, uma vez que foi demonstrado num estudo ultraestrutural a abundância de grânulos citoplasmáticos caracterizados por alto teor lipídico em oócitos nesta espécie (Boni et al., 1992; Gasparrini, 2002). É provável que oócitos e embriões de búfalos sejam mais sensíveis ao estresse oxidativo, devido ao seu alto conteúdo lipídico (Gasparrini et al., 2006) e assim, ao estabelecermos uma redução de 50% da concentração de SFB na MIV, possivelmente contribuiremos para a diminuição desse processo oxidativo na PIVE da espécie.

Apesar de alguns estudos buscarem substituir o SFB nos meios usados na PIVE, com o objetivo de se reduzir o acúmulo lipídico, é importante que se mantenha um equilíbrio entre a quantidade de lipídeos nos oócitos e nos embriões, visto que seu excesso prejudica o processo de criopreservação e qualidade embrionária, porém, sua falta leva ao menor aporte de energia às células. Nesse sentido, recentemente têm surgido estratégias que envolvem a otimização do processo de β -oxidação, como o uso da L-carnitina, por exemplo, nas etapas de MIV e CIV. Dessa maneira, avaliamos em um segundo experimento o uso de L-carnitina em associação à redução de SFB no meio MIV, com o propósito de melhorar o desenvolvimento e qualidade de embriões bubalinos.

Embora a L-carnitina tenha sido usada em diferentes espécies, tais como bovinos (Yamada et al 2006; Chankitisakul et al., 2013; Phongnimitr et al., 2013a; Knitlova, et al., 2017; Spricigo et al., 2017; Held-Hoelker, et al. 2017), ovinos (Reader, et al., 2015; Mishra et al., 2016), suínos (Somfai, et al., 2011), camundongos (Moawad, et al., 2014; Zare, et al., 2015; Khanmohammadi et al., 2016), camelos (Fathi e El-Shahat, 2017), e búfalos (Phongnimitr et al., 2013b), seu papel nos meios de maturação durante no desenvolvimento de embriões não está totalmente esclarecido.

Em nossos estudos, não verificamos o efeito benéfico durante o desenvolvimento embrionário e quantidade de lipídeos dessas estruturas nos oócitos bubalinos. Dentre o fatos que podem auxiliar na explicação para a falta de efeito da L-carnitina durante a MIV, pode estar relacionada a dose utilizada. Ressalta-se que há relato de incremento na taxa de maturação (metáfase II) de oócitos bubalinos submetidos à L-carnitina durante a MIV na concentração de 0,3 mg/mL (Phongnimitr et al., 2013b). Nossos resultados corroboram com outros autores que têm demonstrado baixa influência da L-carnitina nos meios de maturação em suínos, com doses de 10 mM (You et al., 2012). Em ovinos, nas concentrações (0, 2.5, 5, 7.5 e 10 mM) e se observou que somente nos grupos tratados com 10 mM houve melhoria nas taxas de clivagem, mórulas e blastocistos (Mishra et al., 2016). Já em oócitos bovinos, foram utilizados 0,6 mg/mL (3.03 mM) durante 21 horas e não houve interferência na taxa de maturação (metáfase II) (Chankitisakul et al., 2013).

Em nossas condições de estudo, a concentração de 5 mM no meio de MIV não proporcionou melhoria na produção embrionária. Essa concentração foi estabelecida a partir do estudo realizados em bovinos (Leão et al., 2016), já que o número amostral para experimentos de dose-resposta em bubalinos se mostrou bastante limitado. Dessa maneira, acreditamos que mais pesquisas são necessárias para esclarecer os reais mecanismos moleculares da L- carnitina no desenvolvimento embrionário de bubalinos, além do estudo de outras concentrações desse agente no decorrer das diferentes etapas da PIVE.

É possível que os efeitos da L-carnitina sejam melhor evidenciados no decorrer do cultivo embrionário. Em bovinos, a adição de 2,5 mM de L-carnitina a partir do quarto dia do desenvolvimento proporcionou maior sobrevivência embrionária à vitrificação (Lima, 2015). Assim como, promoveu melhores taxas desenvolvimento de blastocistos no cultivo de embriões de duas células em camundongos (Khanmohammadi, et al., 2016). Acredita-se que o efeito positivo observado no estágio de cultivo provavelmente seja pelo fato de haver melhoria do metabolismo de lipídeos mitocondriais e, principalmente, pela atuação da L-carnitina como antioxidante, reduzindo o estresse oxidativo (Abdelrazik et al, 2009; Dunning et al., 2011).

No entanto, ressaltamos que nosso protocolo padrão demonstrou-se bastante satisfatório, já que o grupo controle (10% de SFB) apresentou alta taxa de produção de blastocistos (36,12%) em comparação a relatos da literatura, tais como 18,5% (Manjunatha et al., 2009), 30,1% (Gasparrini et al., 2003) e 26.9 % (Gasparrini et al., 2006), permitindo inclusive a redução de SFB na MIV pela metade da concentração normalmente utilizada de SFB.

Como mantivemos o SFB durante o CIV (1,5%), existe também a possibilidade dos efeitos durante a MIV terem sido de alguma forma anulados, no decorrer do desenvolvimento, já que as duas técnicas de ensaio lipídico, coloração com "oil red" e análise confocal, não mostraram diferenças quanto à composição lipídica das estruturas obtidas após os diferentes tratamentos, nem mesmo entre 0% SFB e 10% SFB.

Concluimos em nosso estudo que é possível reduzir a concentração de SFB até 5% nos meios de maturação *in vitro* para produção de embriões em bubalinos e a suplementação do meio de maturação com L-carnitina na

concentração de 5 mM não proporciona aumento na produção embrionária nesta espécie. Ainda, maiores alterações no acúmulo lipídico ao longo da PIVE não foram constatadas na presença ou ausência de SFB e com a adição de L-carnitina utilizados na MIV, mostrando a necessidade de continuação das pesquisas, principalmente envolvendo a etapa de cultivo *in vitro* de embriões em bubalinos.

5. SUPORTE FINANCEIRO

Este estudo foi apoiado por financiado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA (SEG: 02.13.06.020.00.02.001), órgão vinculado ao Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento.

6. DECLARAÇÃO DE INTERESSE

Nenhum

7. REFERÊNCIAS

Abdelrazik H., Sharma R., Mahfouz R. & Agarwal A. (2009). L-Carnitine decreases DNA damage and improves the *in vitro* blastocyst development rate in mouse embryos. *Fertil. and Steril.* **91**, 589-596.

Abe H. & Hoshi, H. (2003). Evaluation of bovine embryos produced in high performance serum-free media. *J. Reprod. Dev.* **49**, 193–202.

Ali A. & Sirard M. A. (2002). Effect of the absence or presence of various protein supplements on further development of bovine oocyte during *in vitro* maturation. *Biol. Reprod.* **66**, 901–905.

Boni R., Sangella L., Dale B., Rovello S., Di Palo R. & Barbieri V. (1992). Maturazione *in vitro* di oociti bufalini: indagine ultrastrutturale. *Acta Med. Vet.* **38**: 153–61,

Chankitisakul V., Somfai T., Inaba Y., Techakumphu M. & Nagai T. (2013). Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine *in vitro* matured oocytes. *Theriogenology* **79**, 590–598.

Chen J., Hudson E., Chi M.M., Chang A.S., Moley K.H., Hardie D.G., Downs, S.M. (2006) AMPK regulation of mouse oocyte meiotic resumption *in vitro*. *Dev. Biol.* **291**, 227–238.

Del Collado M., Saraiva N.Z., Lopes F.L., Cruz, M.H., Gaspar, R.C., Oliveira C.S., Perecin F. & Garcia J.M. (2014). Efeitos da redução ou substituição do soro fetal bovino por outros compostos na maturação *in vitro* de oócitos bovinos. *Pesq. Vet. Bras.* **34**, 689-694.

Del Collado M., Saraiva N.Z., Lopes F.L., Gaspar R.C., Padilha L.C., Costa R.R., Rossi G.F., Vantini R. & Garcia J.M. (2015). Influence of bovine serum albumin and fetal bovine serum supplementation during *in vitro* maturation on lipid and mitochondrial behaviour in oocytes and lipid accumulation in bovine embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **28**, 1721-1732.

Downs S.M., Mosey J.L. & Klinger J. (2009). Fatty acid oxidation and meiotic resumption in mouse oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* **76**, 844–853.

Dunning K.R., Cashman K., Russell D.L., Thompson J.G., Norman R.J. & Robker, R.L. (2010). Beta-oxidation is essential for mouse oocyte developmental competence and early embryo development. *Biol. Reprod.* **83**, 909–918.

Dunning K.R., Akison L.K., Russell D.L., Norman R.J. & Robker R.L. (2011). Increased beta-oxidation and improved oocyte developmental competence in response to L-carnitine during ovarian *in vitro* follicle development in mice. *Biol. Reprod.* **85**, 548–555.

Dunning K.R. & Robker L.R. (2012). Promoting lipid utilization with L-carnitine to improve oocyte quality. *Anim. Reprod. Sci.* **134**, 69–75.

Fathi M. & El-Shahat K.H. (2017). L-carnitine enhances oocyte maturation and improves *in vitro* development of embryos in dromedary camels (*Camelus dromedaries*). *Theriogenology* **104**, 18-22.

Ferraz M.L., Watanabe Y.F., Joaquim D.C., Watanabe M.R., Accorsi M.F., Meirelles F.V., Sá Filho M.F. & Baruselli P.S. (2005). Produção *in vitro* de embriões bubalinos – resultados preliminares. *Acta Sci. Vet.* **33**, 397.

Feugang J. M., Camargo-Rodríguez O. & Memili E. (2009). Culture systems for bovine embryos. *Livest. Sci.* **121**, 141–149.

Gasparrini B., Sayoud H., Neglia G., Matos D.G., Donnay I. & Zicarelli L. (2003). Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development. *Theriogenology* **60**, 943–952.

Gasparrini, B. (2002) *In vitro* embryo Production in buffalo specie: state of the ART. 2002. *Theriogenology* **57**, 237-256.

Gasparrini B., Boccia L., Marchandise J., Di Palo R., George F., Donnay I. & Zicarelli L. (2006). Enrichment of *in vitro* maturation medium for buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes with thiol compounds: effects of cystine on glutathione synthesis and embryo development. *Theriogenology* **65**, 275–287.

Gasparrini B., De Rosa A., Attanasio L., Boccia L., Di Palo R., Campanile G. & Zicarelli L. (2008). Influence of the duration of *in vitro* maturation and gamete co-incubation on the efficiency of *in vitro* embryo development in Italian Mediterranean buffalo (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.* **105**, 354-364.

Ghanem N., Ha A.N., Fakruzzaman M., Bang J.I., Lee S.C. & Kong I.K. (2014). Differential expression of selected candidate genes in bovine embryos produced *in vitro* and cultured with chemicals modulating lipid metabolism. *Theriogenology* **82**, 238-250.

Held-Hoelker E., Klein S.L., Rings F., Salilew-Wondim D., Saeed-Zidane M., Neuhoef C., Tesfaye D., Schellander K. & Hoelker M. (2017). Cryosurvival of *in vitro* produced bovine embryos supplemented with L-Carnitine and concurrent reduction of fatty acids. *Theriogenology* **96**, 145-152.

Khanmohammadi N., Movahedin M., Safari M., Sameni H.M Behpour Yousefi B., Jafari B., Zarbakhsh S. & Zarbakhsh S. (2016). Effect of L-carnitine on *in vitro* developmental rate, the zona pellucida and hatching of blastocysts and their cell numbers in mouse embryos. *Int. J. Reprod. BioMed.* **14**, 649-656.

Knitlova D., Hulinska P., Jeseta M., Hanzalova K., Kempisty B. & Machatkova M. (2017). Supplementation of L-carnitine during *in vitro* maturation improves embryo development from less competent bovine oocytes. *Theriogenology* **102**, 16-22.

Leão B.C.S., Rocha Frigoni N.A.S., Dall'Acqua P.C., Ambrogi M., Nunes G.B., Rodrigues L.T., Silva M.I.A., Mingoti G.Z. (2016). Supplementation with linolenic acid and L-carnitine during *in vitro* reduced the expression of genes related to lipogenesis but did not alter the lipid content and cryotolerance of *in vitro*-produced embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **29**, 185-185.

Leivas F.G., Brum D.S., Fialho S.S., Saliba W.P., Alvim M.T.T., Bernardic M. L., Rubin M.I.B. & Silva C.A.M. (2011). Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology* **75**, 429-433.

Lim K.T., Jang G., Ko K.H., Lee W.W., Park H.J., Kim J.J., Lee S.H., Hwang W.S., Lee B.C. & Kang S.K. (2007). Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology* **67**, 293-302.

Lim K.T., Jang G., Ko K.H., Lee W.W., Park H.J., Kim J.J., Kang S.K. & Lee B.C. (2008) Improved cryopreservation of bovine preimplantation embryos cultured in chemically defined medium. *Anim. Reprod. Sci.* **103**, 239-48.

Lima, MR. Efeitos de reguladores do metabolismo lipídico no desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos e na sobrevivência à vitrificação. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária - Reprodução Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2015.

Manjunatha B.M., Ravindra J.P., Gupta P.S., Devaraj M. & Nandi S. (2009). Effect of breeding season on in vivo oocyte recovery and embryo production in non-descriptive Indian river buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Anim. Reprod. Sci.* **111**, 376-383.

Mingoti G.Z., Castro V.S.D.C., Méo, S. C., Barreto L.S.S. & Garcia J.M. (2011). The effects of macromolecular and serum supplements and oxygen tension during bovine *in vitro* procedures on kinetics of oocyte maturation and embryo development. *In Vitro Cel. Dev. Biol.* **47**, 361–367.

Mishra A., Reddy I.J., Gupta P.S.P. & Mondal S. (2016). L-carnitine mediated reduction in oxidative stress and alteration in transcript level of antioxidant enzymes in sheep embryos produced *in vitro*. *Reprod. Dom. Anim.* **51**, 311–321.

Moawad A.R., Xu B., Tan S.L. & Taketo T. (2014). L-carnitine supplementation during vitrification of mouse germinal vesicle stage-oocytes and their subsequent *in vitro* maturation improves meiotic spindle configuration and mitochondrial distribution in metaphase II oocytes. *Hum. Reprod.* **29**, 2256-2268.

Phongnimitr T., Liang Y., Srirattana K., Panyawai K., Sripunya N., Treetampinich C. & Parnpai R. (2013). Effect of L-carnitine on maturation, cryo-tolerance and embryo developmental competence of bovine oocytes. *Anim. Sci. J.* **84**, 719-725a.

Phongnimitr T., Liang Y., Srirattana K., Panyawai K., Sripunya N., Treetampinich C. & Parnpai R. (2013). Effects of L-carnitine Supplemented in Maturation Medium on the Maturation Rate of Swamp Buffalo Oocytes. *Buf. Bulletin* **32**, 613-616b.

Reader K.L., Cox N.R., Stanton J.A.L. & Juengel J.L. (2015). Effects of acetyl-L-carnitine on lamb oocyte blastocyst rate, ultrastructure, and mitochondrial DNA copy number. *Theriogenology* **83**, 1484-1492.

Rizos, D., Gutierrez-Adan A., Perez-Garnelo S., De La Fuente J., Boland M. P. & Lonergan P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance and messenger RNA expression. *Biol. Reprod.* **68**, 236-243.

Romek M., Gajda B., Krzysztofowicz E., Kepczynski M., Smorag Z. (2010). New technique to quantify the lipid composition of lipid droplets in porcine oocytes and pre-implantation embryos using Nile red fluorescent probe. *Theriogenology* **75**, 42-54.

Sá Filho M.F., Carvalho N.A.T., Gimenes L.U., Torres-Júnior J.R., Nasser, L.F., Tonhati H., Garcia, J.M., Gasparrini B., Zicarelli L. & Baruselli, P. S. (2009). Effect of recombinant bovine somatotropin (bST) on follicular population and on *in vitro* buffalo embryo production. *Anim. Reprod. Sci.* **113**, 51-59.

Sayirkava H., Misirlioglu M., Kaya A., First N.L., Parrish J.J. & Memili E. (2007). Developmental potential of bovine oocytes cultured in different maturation and culture conditions. *Anim. Reprod. Sci.* **1001**, 225-240.

Somfai T., Kaneda M., Akagi S., Watanabe S., Haraguchi S., Mizutani, E. Dang-Nguyen T.Q, Geshi M, Kikuchi K, Nagai T. (2011). Enhancement of lipid metabolism with L-carnitine during *in vitro* maturation improves nuclear maturation and cleavage ability of follicular porcine oocytes. *Reprod. Fertil. Dev.* **23**, 912-920.

Spricigo J.F., Morato R., Arcarons N., Yeste M., Dode M.A., Lopez-Bejar M. & Mogas T. (2017). Assessment of the effect of adding L-carnitine and/or resveratrol to maturation medium before vitrification on *in vitro*-matured calf oocytes. *Theriogenology* **89**, 47-57.

Wrenzycki C., Herrmann D. & Niemann, H. (2007). Messenger RNA in oocytes and embryos in relation to embryo vitality. *Theriogenology* **68**, 77-83.

Yamada T., Imai H. & Yamada M. (2006). Beneficial effects of acetyl-L-carnitine treatment during IVM on post-fertilization development of bovine oocytes *in vitro* *Reprod Fertil Dev.* **18**, 280-281.

Yang X., Dunning K.R., Wu L.L-Y., Hickey T.E., Norman R.J., Russel D.L., Liang X. & Robker R.L. (2010). Identification of Perilipin-2 as a lipid droplet protein regulated in oocytes during maturation. *Reprod. Fertil. Dev.* **22**, 1262-1271.

You J, Lee J, Hyun S.H. & Lee E. (2012). L-carnitine treatment during oocyte maturation improves *in vitro* development of cloned pig embryos by influencing intracellular glutathione synthesis and embryonic gene expression. *Theriogenology* **78**, 235–43.

Zare Z., Farahani R.M., Salehi M., Piryaee A., Novin M.G. Fathabadi, F.F. Mohammadi M. & Dehghani-Mohammadabadi M. (2015). Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. *J. Assist. Reprod. Genet.* **32**, 635-643.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na atualidade, é possível constatar que ainda há dificuldade para a obtenção de sucesso na produção *in vitro* de embriões na espécie bubalina. Os resultados são muitas vezes inconsistentes e inferiores às taxas de PIVE obtidas em bovinos. Dessa forma, nossos estudos contribuem para a evolução de protocolos para a PIVE na espécie, uma vez que foi constatado que é possível reduzir a concentração de SFB até 5% nos meios de maturação *in vitro* para produção de embriões em bubalinos, o que potencialmente refletirá em benefícios para a qualidade do embrião produzido.

Apesar de vários estudos relatarem efeitos positivos da L-carnitina em várias espécies e diferentes práticas de laboratório, a suplementação do meio de maturação com L-carnitina na concentração de 5 mM não proporcionou aumento na produção embrionária nesta espécie. Com isso, sugere-se estudos futuros envolvendo diferentes concentrações de L-carnitina.

Alterações no acúmulo lipídico ao longo da PIVE não foram constatadas após a MIV na presença ou ausência de SFB. Diante disso, há necessidade de continuação das pesquisas, principalmente envolvendo a etapa de cultivo *in vitro*, aperfeiçoando-se os métodos para avaliação da maturação, associados a metodologias moleculares para melhor determinação da competência oocitária. Acreditamos que com isso, poderão ser adotados protocolos específicos para a PIVE em bubalinos, proporcionando melhores resultados e viabilizando a produção de embriões em larga escala.