



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGb
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

ALLANA MARIA FREIRE LEITÃO

**INFLUÊNCIA DA ACETIL-L-CARNITINA NO DESENVOLVIMENTO DE
FOLÍCULOS OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO***

SOBRAL

2023

ALLANA MARIA FREIRE LEITÃO

INFLUÊNCIA DA ACETIL-L-CARNITINA NO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS
OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área Temática: Fisiologia Reprodutiva.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Viana Silva.

Coorientador: Prof. Dr. Fabrício Sousa Martins.

SOBRAL

2023

ALLANA MARIA FREIRE LEITÃO

INFLUÊNCIA DA ACETIL-L-CARNITINA NO DESENVOLVIMENTO DE FOLÍCULOS
OVARIANOS PRÉ-ANTRAIS BOVINOS CULTIVADOS *IN VITRO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Análises Integrativas de Sistemas Biológicos. Área Temática: Fisiologia Reprodutiva.

Aprovada em 20/10/2023.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Viana Silva (Orientador)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fabrício Sousa Martins (Coorientador)

Universidade Estadual Vale do Acaraú (UEVA)

Prof^ª. Dra. Laís Raiane Feitosa Melo Paulino

Faculdade Ieducare (FIED)

Prof. Dr. José Jackson do Nascimento Costa

Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha mãe.

AGRADECIMENTOS

A Deus que tudo providencia, e me permitiu viver essa trajetória, me sustentando para enfrentar desafios que antecedem vitórias que só Ele conhece, sou grata.

À minha mãe, Maria Marta Freire, todo o meu amor por sempre ter sido minha provedora em todos os aspectos, por me ensinar com seus exemplos de vida a ser uma pessoa honesta e íntegra, sou grata.

Ao meu pai, José Francisco Leitão e meus irmãos, Francisco Alex Freire Leitão e Ana Larah Freire Leitão, por todo carinho e compreensão que me fazem ter a certeza de ser amada, sou grata.

À minha sobrinha Pérola Araújo Freire, por sua inocência e por ser a preciosidade e alegria na minha vida, sou grata.

Ao meu companheiro de vida, José Lucas Araújo de Lima, pelo amor, cuidado, parceria e incentivo em todos os dias, sou grata.

Ao meu psicólogo Paulo Henrique da Ponte Portela por todo suporte profissional, sou grata.

À amizade e companheirismo de Ana Jéssica Matos de Oliveira, Jaine de Sousa Santos e Efigênia Cordeiro Barbalho, que acreditam em mim para além dessa jornada, sou grata.

Aos meus colegas do grupo de pesquisa, pelos momentos e conhecimentos compartilhados, e amigas criadas para além da bancada, sou grata.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Fabrício Sousa Martins, pela partilha de conhecimentos e empatia em nossos encontros, além da confiança repassada, sou grata.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Roberto Viana Silva, por me acolher em seu grupo, por todos os ensinamentos, paciência e compreensão, e pela orientação na construção desse trabalho, sou grata.

Aos professores membros da banca examinadora pelas valiosas contribuições, sou grata.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), e ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – PPGb pela oportunidade da realização do mestrado acadêmico, sou grata.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos, sou grata.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Não se amoldem ao padrão deste mundo, mas transformem-se pela renovação da sua mente, para que sejam capazes de experimentar e comprovar a boa, agradável e perfeita vontade de Deus. (Romanos 12:2)

RESUMO

A biotécnica de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos visa proporcionar crescimento e desenvolvimento de folículos pré-antrais. Um dos principais entraves do cultivo *in vitro* de folículos ovarianos é a formação em excesso das espécies reativas de oxigênio (EROS) que ocasionam o estresse oxidativo (EO). Desse modo, há a necessidade de suplementar os meios de cultivo *in vitro* com substâncias antioxidantes. Com esse propósito, a acetil-L-carnitina se apresenta com potencial antioxidante e anti-apoptótico, podendo auxiliar na redução das EROS e danos ao DNA durante o cultivo *in vitro*. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos da acetil-L-carnitina durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais inclusos no tecido ovariano bovino. O estudo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA da Universidade Federal do Ceará *Campus* Sobral sob o protocolo N° 03/22. Para tal, ovários bovinos de 16 vacas foram submetidos a fragmentação do córtex ovariano. Parte dos fragmentos foram fixados em paraformaldeído a 4% (controle não cultivado) ou cultivados em meio controle (α -MEM⁺) sozinho ou suplementado com 10, 50 ou 100 μ M de acetil-L-carnitina a 38,5°C, 5% de CO₂, durante 6 dias. Ao final do cultivo, tecidos cultivados e não cultivados foram destinados para histologia clássica para avaliação da morfologia, ativação e crescimento folicular, densidade de células do estroma, e conteúdo de colágeno na matriz extracelular. Além disso, avaliou-se os níveis de RNAm para superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), peroxirredoxina 6 (PRDX6) e fator nuclear eritroide 2 (NRF2) por PCR em tempo real. Os dados obtidos foram analisados pelo GraphPad Prisma (9.0). A porcentagem de folículos normais, primordiais, em desenvolvimento foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado. As demais avaliações foram realizadas por meio do teste de Kruskal-Wallis. As diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Os resultados mostraram que os tecidos cultivados na presença de 100 μ M de acetil-L-carnitina tiveram níveis significativamente mais elevados de folículos morfológicamente normais do que aqueles cultivados em α -MEM⁺ ($P < 0,05$). Além disso, tecidos cultivados em 100 μ M de acetil-L-carnitina apresentaram maior densidade de células do estroma quando comparados com o controle não cultivado, já para a ativação, e quanto aos níveis de colágeno e a PCR, não foram percebidas diferenças significativas ($P < 0,05$). Em conclusão, 100 μ M de acetil-L-carnitina melhora a morfologia folicular e mantém preservada a densidade de células do estroma ovariano após 6 dias de cultivo.

Palavras-chave: acetil-L-carnitina; antioxidantes; bovinos; folículos pré-antrais; ovário artificial

ABSTRACT

The *in vitro* culture of ovarian follicles aims to provide growth and development of preantral follicles. One of the main obstacles to the *in vitro* cultivation of ovarian follicles is the excess formation of reactive oxygen species (ROS), which cause oxidative stress (OS). There is therefore a need to supplement *in vitro* culture media with antioxidant substances. To this end, acetyl-L-carnitine has antioxidant and anti-apoptotic potential and can help reduce EROS and DNA damage during *in vitro* cultivation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of acetyl-L-carnitine during the *in vitro* culture of preantral follicles embedded in bovine ovarian tissue. The experimental study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals - CEUA of the Federal University of Ceará Sobral Campus under protocol N° 03/22. To this end, bovine ovaries from 16 cows were subjected to fragmentation of the ovarian cortex. Part of the fragments were fixed in 4% paraformaldehyde (uncultured control) or cultured in control medium (α -MEM⁺) alone or supplemented with 10, 50 or 100 μ M acetyl-L-carnitine at 38.5°C, 5% CO₂, for 6 days. At the end of culture, cultured and uncultured tissues were sent for classical histology to assess morphology, follicle activation and growth, stromal cell density, and collagen content in the extracellular matrix. In addition, mRNA levels for superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), peroxiredoxin 6 (PRDX6) and nuclear factor erythroid 2 (NRF2) were assessed by real-time PCR. The data obtained was analyzed using GraphPad Prisma (9.0). The percentage of normal, primordial and developing follicles was analyzed using the Chi-square test. The other evaluations were carried out using the Kruskal-Wallis test. Differences were considered significant when $P < 0.05$. The results showed that tissues cultured in the presence of 100 μ M acetyl-L-carnitine had significantly higher levels of morphologically normal follicles than those cultured in α -MEM⁺ ($P < 0.05$). In addition, tissues cultured in 100 μ M acetyl-L-carnitine showed a higher density of stromal cells when compared to the non-cultured control, while for activation, collagen levels and CRP, there were no significant differences ($P < 0.05$). In conclusion, 100 μ M acetyl-L-carnitine improves follicular morphology and maintains the density of ovarian stromal cells after 6 days of culture.

Key-words: acetyl-L-carnitine, antioxidants, artificial ovary; cattle; pre-antral follicles

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 - Estrutura ovariana ilustrando a presença de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento e corpos lúteos.....	11
Figura 2 - Efeitos do estresse oxidativo aos vasos sanguíneos, ao interstício, aos folículos e ao corpo lúteo no ovário, e nos folículos causando danos aos oócitos, células da granulosa, células intersticiais do ovário e tecido folicular.	14
Figura 3 - Danos intracelulares do estresse oxidativo em oócitos	15
Figura 4 - Mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio.....	17
Figura 5 - Oxidação de ácidos graxos	20
Figura 6 - Mecanismo de ação da L-carnitina.....	21
Figura 7 - Efeitos da L-Carnitina durante o cultivo de oócitos e embriões.	22
Figura 8 - Reação da carnitina acetiltransferase	24
Figura 9 - Proposta de utilização da Acetil-L-Carnitina exógena no metabolismo central. .	25
Figura 10 - Distribuição celular de carnitina aciltransferase na facilitação do metabolismos de ácidos graxos.	26
Figura 11 - (a) Estruturas moleculares de L-carnitina e acetil-L-carnitina, (b) funções sistêmicas e reprodutivas de L-carnitina.	28

CAPÍTULO I

Figure 1 - Direct and indirect effects of L-carnitine on the female reproductive system of mammals.....	36
--	-----------

CAPÍTULO II

Figure 1 - Representative images of bovine ovarian tissue cultured <i>in vitro</i> for 6 days showing morphologically normal (A – C) and degenerated (D – F) follicles from different stages of development stained with hematoxylin and eosin. (A) Normal and (D) Degenerated primordial follicles; (B) normal and (E) degenerated primary follicles; (C) Normal secondary follicle and (F) degenerated. Granulosa cells (GC); Oocyte (O); Oocyte nucleus (N). (400×, Scale bar: 100 µm).	57
Figure 2 - Percentage of normal follicles in uncultured ovarian tissues or in tissues cultured in α -MEM ⁺ alone or supplemented with 10, 50, or 100 µM Acetyl-L-carnitine for 6 days. *Represents a significant difference compared to the non-cultured control. a,b Different letters represent statistically significant differences between treatments (P < 0.05).	58
Figure 3 - Percentage of primordial and developing follicles in uncultured ovarian tissue cultured in α -MEM ⁺ alone or supplemented with 10, 50, or 100 µM Acetyl-L-carnitine for 6 days. *Represents a statistically significant difference between treatments (P < 0.05). ..	59
Figure 4 - Stromal cell density in uncultured ovarian tissues and in tissues cultured in α -MEM ⁺ alone or with 10, 50, or 100 µM Acetyl-L-carnitine for 6 days. Lowercase letters a and b represent statistically significant differences between treatments (P < 0.05).	60
Figure 5 - Representative images of ovarian stromal cell density tissues and in tissues cultured in α -MEM ⁺ alone or with 10, 50, or 100 µM Acetyl-L-carnitine for 6 days. (A) Fresh control; (B) α -MEM ⁺ ; (C) 10 µM; (D) 50 µM; (E) 100 µM. (400× Scale bar: 100 µm).	60
Figure 6 - Collagen fiber levels in uncultured and cultured ovarian tissue in α -MEM ⁺ alone or with 10, 50 or 100 µM Acetyl-L-carnitine for 6 days. *Represents a statistically significant difference compared to the non-cultured control (P < 0.05).....	61
Figure 7 - Representative images of collagen fibers stained by Picrosirius red. (A) Fresh control; (B) α -MEM ⁺ ; (C) 10 µM; (D) 50 µM; (E) 100 µM.	62

Figure 8 - Levels of mRNA for (A) CAT, (B) SOD, (C) GPX1, (D) PRDX6 and (C) NRF2 in ovarian tissue cultured in α -MEM⁺ alone or with 100 μ M Acetyl-L-carnitine for 6 days. * Represents statistically significant difference between treatments ($P < 0.05$). **63**

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1 - Effects of L-carnitine during in vitro culture of follicles, oocytes and embryos in different species.	39
--	-----------

CAPÍTULO II

Table 1 – Primer sequence	56
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGL	Ácido graxo livre
ALC	Acetil-L-carnitina
ATP	Adenosina trifosfato
BHB	β -hidroxibutirato
CAT	Catalase
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
CIV	Cultivo <i>in vitro</i> de embriões
CoA	Coenzima A
CPT	Carnitina Palmitoil Transferase
CPT1	Carnitina Palmitoil Transferase 1
CPT2	Carnitina Palmitoil Transferase 2
CRAT	Enzimas carnitina acetil transferase
CROT	Octanol Transferase de cadeia média
Cu/Zn-SOD	Superóxido dismutase de cobre e zinco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EC-SOD	Superóxido dismutase glicoproteína extracelular
EO	Estresse oxidativo
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FACS	Acil-CoA graxo sintase
FAS	Ácido graxo sintase
FFA	Ácido graxo livre
FSH	Hormônio folículo estimulante
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Glutathione
GSSG	Glutathione oxidada
HAT	Histona acetiltransferase
HS-CoA	Forma da Coenzima A
IA	Inseminação artificial
IATF	Inseminação Artificial em Tempo Fixo
IMM	Membrana mitocondrial interna

LC	L-carnitina
MEC	Matriz extracelular
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
Mn-SOD	Superóxido dismutase dependente de manganês
MPTP	Poro de transição de permeabilidade mitocondrial
NRF2	Fator nuclear eritroide 2
OCTN2	Receptor transportador de cátions orgânicos novel 2
OMM	Membrana mitocondrial externa
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIVE	Produção <i>in vitro</i> de embriões
PRDX6	Peroxirredoxina 6
PRL	Prolactina
RE	Retículo endoplasmático
SOD	Superóxido dismutase
SOP	Síndrome dos ovários policísticos
TCA	Ciclo do ácido tricarboxílico
TE	Transferência de embriões
TRA	Tecnologias de reprodução assistida
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
α	Alfa
β	Beta
μM	Micromolar
>	Maior que
<	Menor que
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
Ca^{2+}	íons de cálcio
CH_3	Metil
CO_2	Dióxido de Carbono
Cu	Cobre
E_2	Estradiol
Fe^{2+}	Ferro II
Fe^{3+}	Ferro III
H_2O	Água
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
H_3C	Metanol
mm	Milímetro
Mn	Manganês
N^+	Íons nitrogênio
Na^+	Íons sódio
O^-	ânion oxigênio
O_2	Molécula de oxigênio
$\text{O}_2^{\circ-}$	Ânion superóxido
OH	Hidroxila
OH°	Radical hidroxila
P	Nível de significância amostral
P_4	Progesterona
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 Segurança alimentar e produção de alimentos de origem animal.....	9
2.2 Biotécnicas da reprodução animal e melhoramento genético.....	9
2.3 Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais.....	10
2.4 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo durante o cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	13
2.5 Compostos antioxidantes como suplementos de meio de cultivo de folículos pré-antrais	15
2.6 Aspectos químicos e biológicos da L-carnitina.....	18
2.7 Acetil-L-Carnitina no metabolismo de lipídios	23
2.8 Potencial antioxidante da L-carnitina e Acetil-L-Carnitina.....	27
CAPÍTULO I	30
3 JUSTIFICATIVA	47
4 HIPÓTESES	48
5 OBJETIVOS	49
5.1 Objetivo geral	49
5.2 Objetivos específicos	49
CAPÍTULO II.....	50
6 CONCLUSÕES GERAIS	70
7 PERSPECTIVAS.....	71

REFERÊNCIAS	72
ANEXO.....	84

1 INTRODUÇÃO

A espécie bovina tem grande importância econômica para o Brasil contribuindo diretamente para a exportação de carne, bem como para a geração de emprego e renda em diversos estados (Soares; Martins; dos Santos Brito, 2019). Dentre os fatores que influenciam na produção animal e na segurança alimentar, é possível citar a nutrição, a genética e a reprodução, que podem ser otimizados por meio de melhores programas nutricionais, seleção genética e utilização de biotécnicas reprodutivas (Moreira *et al.*, 2019). No que se refere às biotécnicas reprodutivas, estratégias para o aumento da produtividade têm sido investigadas, para possibilitar um aumento no potencial reprodutivo de animais de interesse zootécnico como os bovinos (Figueiredo; Lima, 2017). Dentre as biotécnicas reprodutivas, destacam-se a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE), e a produção *in vitro* de embriões (PIVE) (Nogueira; Mingoti; Nicacio, 2013).

O cultivo *in vitro* de folículos ovarianos (CIV), é uma parte importante da biotécnica de PIVE, nessa biotécnica reprodutiva, os folículos ovarianos podem ser cultivados inclusos no córtex ovariano ou de maneira isolada (ARAÚJO *et al.*, 2014), sendo a técnica de cultivo *in vitro* de tecido ovariano mais próxima das condições *in vivo* (Aguiar *et al.*, 2016). Enquanto o cultivo de folículos isolados, consiste no desprendimento dos folículos do córtex e na utilização de meio que mimetize as condições encontradas *in vivo*, devendo fornecer substâncias capazes de influenciar na sobrevivência e crescimento folicular, formação de antro, manutenção da morfologia e viabilidade (Paulino *et al.*, 2022). Assim sendo, é importante a investigação de substâncias que sobre esse sistema possam interagir melhor com o meio. No entanto, embora significativo progresso já tenha sido obtido, o crescimento *in vitro* de folículos ovarianos ainda enfrenta importantes limitações, sendo a principal delas a ocorrência do estresse oxidativo (EO).

O EO ocorre quando há um desbalance entre o sistema antioxidante da célula e a quantidade de espécies reativas de oxigênio (EROS) produzidas (Soto-Heras; Paramio, 2020). Os efeitos deletérios do EO incluem as alterações de moléculas intracelulares através de reações de oxidação que podem afetar negativamente o DNA, proteínas e lipídios de membrana (Sahebkar *et al.*, 2015). Como consequência, esses danos afetam processos e funções celulares, podendo ocasionar morte celular dos gametas cultivados *in vitro* por apoptose ou necrose (JIANG *et al.*, 2019; SILVA; ARAÚJO; FIGUEIREDO, 2011; HALLIWELL, 2006), afetando as células do estroma, matriz extracelular e enzimas antioxidantes (Grosbois *et al.*, 2023). Portanto, a fim de desenvolver um sistema de cultivo folicular satisfatório, faz-se necessário

que os meios de cultivo sejam suplementados com compostos antioxidantes capazes de minimizar os danos ocasionados pelo EO (Rossetto *et al.*, 2013).

Dentre as substâncias que vem apresentando potencial antioxidante, destaca-se a L-carnitina que é um composto de amônio quaternário solúvel em água. A L-carnitina é necessária no transporte de ácidos graxos do citosol para as mitocôndrias a fim de gerar energia metabólica enquanto ocorre quebra de lipídios (Modak *et al.*, 2022). Quando administrados exogenamente, a acetil-L-carnitina demonstrou ter maior biodisponibilidade em comparação com L-carnitina e tem sido relatado como tendo impactos benéficos nas funções reprodutivas (Agarwal; Sengupta; Durairajanayagam, 2018; Aliabadi *et al.*, 2012; Cheng; Chen; 2008). O mecanismo de ação da L-carnitina consiste em neutralizar as EROS por meio do aumento da produção de energia por β -oxidação, reduzindo assim o EO, eliminando radicais livres e dano oxidativo, além de inibir caspases para prevenir apoptose celular (Agarwal; Sengupta; Durairajanayagam, 2018). Com isto, ressalta-se a importância de estudos que possam evidenciar os benefícios antioxidantes da L-carnitina e acetil-L-carnitina para auxiliar no controle da formação de EROS no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos. Vale mencionar que até o presente momento, ainda não se tem conhecimento dos efeitos da acetil-L-carnitina no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos, tornando este um estudo pioneiro com esta técnica e esta classe de folículos.

Nesse sentido, a revisão de literatura apresentada a seguir foi desenvolvida com o intuito de abordar importantes tópicos da produção animal, como a segurança alimentar e produção de alimentos de origem animal, biotécnicas da reprodução animal no melhoramento genético, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais, compostos antioxidantes como suplementos de meio de cultivo de folículos pré-antrais, aspectos químicos e biológicos da L-carnitina, Acetil-L- Carnitina e metabolismo de lipídios, e potencial antioxidante da L-carnitina e Acetil-L- Carnitina.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Segurança alimentar e produção de alimentos de origem animal

A segurança alimentar é um fator de elevada importância a ser considerado globalmente, pois os seus impactos poderão ser sentidos por todas as partes do mundo. Vem sendo estimado que mais de 80% da produção de carne bovina esperada mundialmente até o ano de 2029 deva ser proveniente de países como África do Sul, Argentina, Brasil, China e Paquistão, para que isso seja alcançado, a eficiência de produção se apresenta como desafio para a sustentabilidade dessa importante produção bovina (Mueller E Van Eenannaam, 2022). Demonstrando a necessidade de investigar fatores genéticos. Nesse contexto, já vem sendo observado um aumento considerável nas últimas décadas na produção média de leite em vacas leiteiras como resultado de seleção genética intensiva (Ferst *et al.*, 2020).

Outro aspecto relevante é o da possibilidade da produção de alimentos não acompanhar o aumento populacional, e o fato de a produção de carne global está dividida entre países desenvolvidos e países em desenvolvimento, pois é importante salientar que não acontece o mesmo em relação aos impactos ambientais, e da mesma forma a diminuição de áreas de pastagens para criação de animais, requerem atenção especial (FAO, 2021b). Estratégias precisam ser elaboradas para melhorar o potencial produtivo da espécie bovina, como por exemplo, por meio do melhoramento genético, buscando acelerar progressos, e aprimorar a reprodução, preservando características desejáveis que serão repassadas adiante com a finalidade de reduzir o intervalo entre gerações (Bourdon *et al.*, 2021). Dessa forma, pode ser feito uso de biotécnicas reprodutivas que intensificam a seleção desses animais.

2.2 Biotécnicas da reprodução animal e melhoramento genético

Visando o aumento da produtividade, podem ser utilizados alguns recursos para que seja aprimorada a seleção dos animais de produção. Nesse sentido, vem sendo desenvolvidas tanto para animais quanto para humanos Tecnologias de Reprodução Assistida (TRA) que buscam a preservação de gametas, realizando seleções a partir das espécies e raças de interesse, podendo também ser realizado conservação de espécies ameaçadas de extinção (Vilela *et al.*, 2021; Barberino *et al.*, 2018; Comizzoli *et al.*, 2009). Moraes *et al.* (2023) demonstram avanços e descobertas de novas abordagens que tem como objetivo aumentar o número de oócitos e/ou

embriões para uma genética superior, e obtenção de maior controle da ovulação, bem como a promoção de contracepção para controlar tanto populações de animais domésticos como selvagens. O cultivo *in vitro* (CIV) de folículos pré-antrais é uma técnica importante para a reprodução assistida, permitindo o desenvolvimento de óvulos em ambiente controlado, fora do organismo. Entre as biotecnologias mais comumente utilizadas para fins de manipulação reprodutiva, destacam-se também a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE). Essas técnicas têm sido amplamente aplicadas para otimizar o sucesso reprodutivo e viabilizar a reprodução em diversas espécies, especialmente em contextos de infertilidade ou preservação genética.

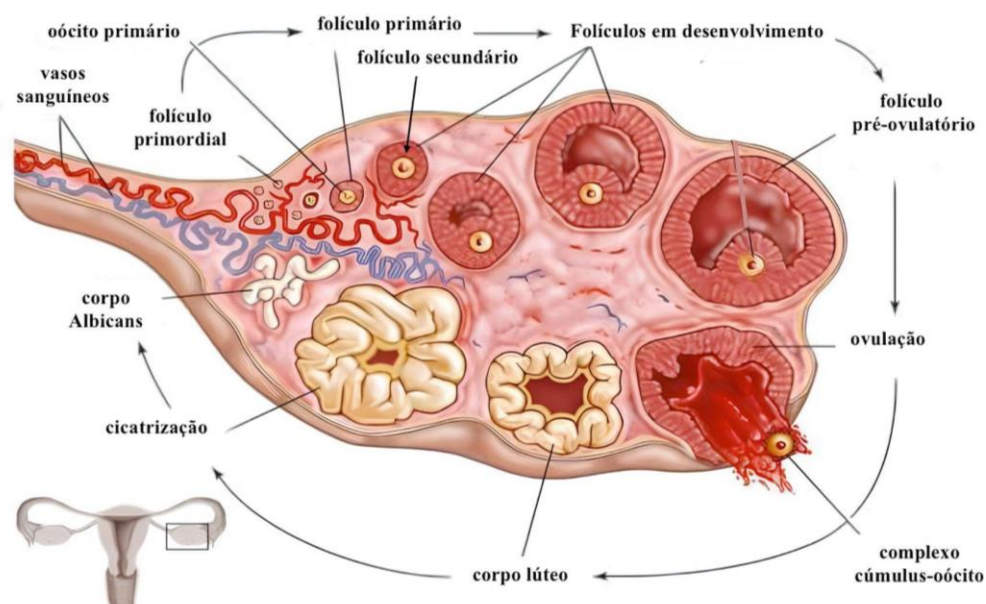
2.3 Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma biotécnica que permite resgatar a população folicular do ovário antes que se tornem atresícos, e cultivá-los até estágios de amadurecimento oocitário para posterior fertilização *in vitro* e produção de embrião, funcionando, assim, como um ovário artificial (Figueiredo *et al.*, 2019). Para preservar parte da população folicular antes da degeneração, foi desenvolvido o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos pré-antrais, onde os folículos pré-antrais podem ser cultivados *in situ* (dentro do tecido ovariano) ou de forma isolada (Silva *et al.*, 2022; Telfer *et al.*, 2000). Assim, o cultivo *in vitro* de tecido ovariano tem o objetivo de estudar o desenvolvimento inicial de folículos primordiais e primários, e o cultivo de folículos isolados têm maior foco nos folículos secundários (Silva *et al.*, 2022; Figueiredo *et al.*, 2011; Telfer *et al.*, 2000).

O cultivo dos folículos pré-antrais se apresenta então como uma alternativa para melhorar o desenvolvimento folicular *in vitro*, visto que essa categoria folicular está presente em maiores quantidades no ovário (Paulino *et al.*, 2018). Na espécie bovina, e em outros mamíferos, o desenvolvimento folicular *in vitro* a partir de folículos pré-antrais, é um processo demorado e os folículos necessitam de condições adequadas, a fim de que possam obter crescimento satisfatório (Candelaria; Denicol, 2019).

In vivo, o desenvolvimento folicular acontece no ovário. A estrutura do ovário de mamíferos é composta por uma porção cortical e uma medular. O córtex é a parte principal do ovário, contendo vários níveis de folículos em desenvolvimento, corpo lúteo, tecido intersticial, entre outras estruturas, enquanto a medula é composta principalmente de vasos sanguíneos, nervos, vasos linfáticos e tecido conjuntivo frouxo (Hu *et al.*, 2023; Frances-Herrero *et al.*, 2022). Na figura 1 estão apresentadas algumas das principais estruturas morfológicas do ovário.

Figura 1 - Estrutura ovariana ilustrando a presença de folículos ovarianos em diferentes estágios de desenvolvimento e corpos lúteos



Fonte: Adaptado de LUZ (2018).

Os ovários mamíferos contêm de milhares a milhões de oócitos imaturos, dos quais cerca de 90% são folículos pré-antrais ovarianos (primordiais, primários e secundários). Apesar dessa grande população, apenas cerca de 0,1% serão ovulados e o restante possivelmente sofrerá atresia folicular (Silva *et al.*, 2022; Van Der Hurk & Zhao, 2005). A atresia folicular é um processo degenerativo já conhecido que pode ocorrer em qualquer estágio da foliculogênese (Pei *et al.*, 2023).

Após o nascimento, a fêmea bovina conta com uma reserva ovariana de cerca de 300.000 folículos primordiais, que não é reabastecida posteriormente em circunstâncias fisiológicas normais (Sarma; Findlay; Hutt, 2019). Ao nascer, os ovários dos ruminantes são compostos por milhares de oócitos imaturos, sendo em sua grande maioria folículos pré-antrais, que representam a principal reserva de oócitos (Figueiredo *et al.*, 2019).

Nesse sentido, o cultivo de tecido ovariano se apresenta como uma metodologia promissora para o crescimento de folículos *in vitro*, devido à facilidade de manuseio e à possibilidade de que seja reconstituído o microambiente ovariano, ou ainda que se possa manipular condições desejáveis para induzir o crescimento folicular (Pais *et al.*, 2021; Higuchi *et al.*, 2015). Nessa forma de cultivo, os folículos ovarianos pré-antrais são incluídos no córtex do tecido do ovário, a fim de evitar a exposição prolongada das células estromais ao ambiente

externo, visando manter sua integridade e a estrutura dos folículos que se sustentam no tecido estromal ovariano durante o período de cultivo (Pais *et al.*, 2021).

A incubação de folículos pré-antrais e células estromais em tecido ovariano cultivado pode ter influência na produção de fatores de crescimento e de peptídeos que são essenciais para o desenvolvimento folicular, tornando possível a observação da resposta às substâncias tanto dos folículos como do próprio tecido ovariano (Cavalcante *et al.*, 2019; Picton *et al.*, 2008). É importante que o contato entre os folículos e as células do estroma presentes na Matriz Extracelular (MEC) do ovário seja mantido. Durante a ativação dos folículos primordiais, acontecem processos de rigidez e afrouxamentos naturalmente na MEC do ovário, pois ela está constantemente em modelação (Grosbois *et al.*, 2023). Isso ocorre, pois, a MEC é rica em propriedades que conferem a ela resistência, como glicoproteínas, elastina e colágeno (Tang, 2020). Favorecendo assim, o crescimento folicular conforme foi descrito por Aguiar *et al.* (2016), pois o ambiente estando nessas condições, se assemelha às condições *in vivo*, podendo ainda facilitar melhor perfusão do meio de cultivo de folículos isolados.

Em contrapartida, o isolamento dos folículos pode proporcionar um acompanhamento individual do desenvolvimento folicular *in vitro*, em um meio de cultivo com substâncias de interesse, pois caso aconteça atresia folicular, as substâncias não afetarão outros folículos que estarão próximos (Mbemba *et al.*, 2019).

O sistema de cultivo de folículos isolados pode ser realizado pela utilização de sistemas bidimensional, tridimensional ou os dois tipos (Araújo *et al.*, 2014). No estudo da fisiologia ovariana, a estratégia que vem sendo bastante utilizada é o cultivo bidimensional (Felgueiras *et al.*, 2020), sistema esse em que o folículo é colocado diretamente na placa de cultivo (SILVA *et al.*, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2014), sobre camada de matriz extracelular ou mesmo em camada de células somáticas (Vanacker; Amorim, 2017). Já foi demonstrado que em espécies domésticas como bovinos, os folículos secundários isolados são capazes de crescer e formar antro nessas condições de cultivo (Vasconcelos *et al.*, 2020; Paulino *et al.*, 2020). No sistema tridimensional, é feita a inserção do folículo em monocamada de substratos com matriz extracelular ou componentes do estroma ovariano a fim de manter sua morfologia, e interações célula-célula e matriz-célula que têm importância quanto a regulação de desenvolvimento dos folículos (Araújo *et al.*, 2014).

Esses sistemas fornecem modelos de cultivo que proporcionam uma melhor investigação da fisiologia ovariana (Shoorei *et al.*, 2018; Brito *et al.*, 2014). Utilizando o método mecânico de isolamento, que tem como vantagem a separação de folículos do tecido ovariano de maneira mais simplificada em busca de folículos viáveis morfológicamente, já foi

observado que folículos pré-antrais bovinos podem desenvolver-se *in vitro* até o estágio antral, sendo possível perceber que os folículos pré-antrais são a maioria da população de folículos ovarianos e tendo sua utilização como fonte de oócitos homogêneos para biotecnologias reprodutivas (Paulino *et al.*, 2020). Portanto, sabendo que o cultivo é uma excelente alternativa para a obtenção de oócitos competentes para fertilização, é premente a elaboração de pesquisas sobre as necessidades foliculares e a influência das EROS nos sistemas *in vitro*.

2.4 Espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

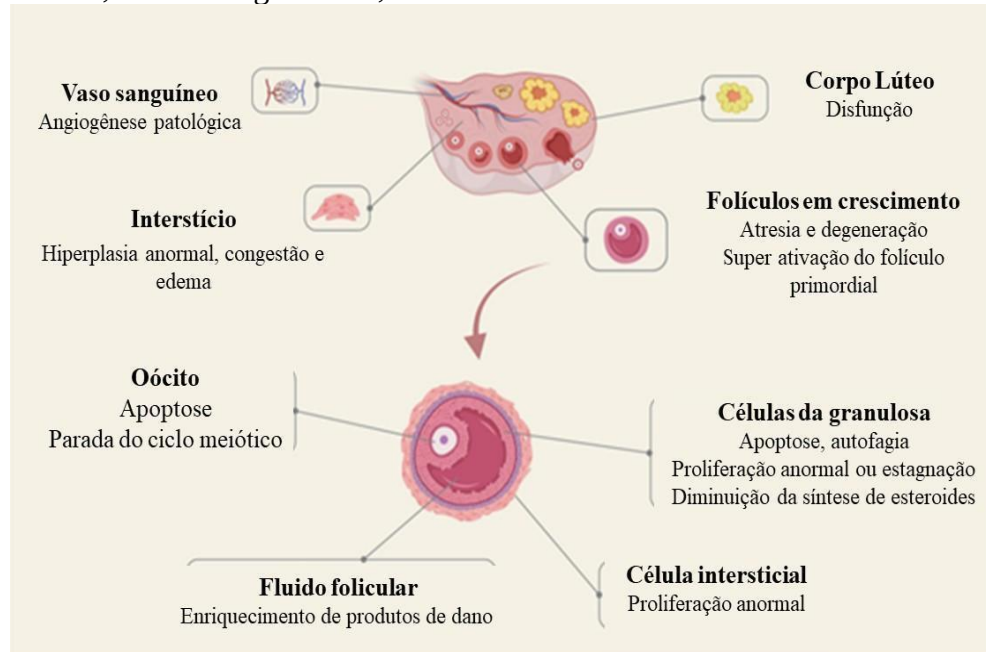
As espécies reativas de oxigênios (EROS) são uma categoria molecular que inclui derivados da reação de redução do oxigênio (O_2), radicais livres e não radicais. As EROS são produzidas a partir do metabolismo do oxigênio celular devido à redução incompleta do oxigênio, que acontece por exemplo no metabolismo mitocondrial durante a respiração celular (Cacciottola *et al.*, 2021; Abramov *et al.*, 2007; Caglayan *et al.*, 2017). As EROS são originadas principalmente como subprodutos de fosforilação oxidativa mitocondrial (Yan *et al.*, 2022). Aparecem como resultado do fornecimento de energia proveniente das mitocôndrias, e nesse aspecto, as EROS se tornaram conhecidas por serem moléculas de sinalização quando seus níveis não estão dentro dos limites fisiológicos (Placidi *et al.*, 2022; Venditti *et al.*, 2020).

Em uma quantidade moderada, as EROS são consideradas essenciais para que as funções fisiológicas do corpo aconteçam de maneira satisfatória, pois atuam no equilíbrio entre os sistemas oxidativo e antioxidante (Yan *et al.*, 2022). Quando em altas concentrações, as EROS podem causar danos ao DNA, aos lipídios e proteínas (CACCIOTTOLA *et al.*, 2021; KIM *et al.*, 2017), danos nas células estromais ovarianas e na matriz extracelular (GROSBOIS *et al.*, 2023) ou mesmo quando acontece um aumento na utilização de antioxidantes no organismo, as reações redox ficam em estado de desequilíbrio, o que desencadeia o EO (Yan *et al.*, 2022).

Os principais tipos de EROS quando relacionadas às funções fisiológicas são: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido ($O_2^{\circ-}$) e radical hidroxila (OH°) (LU *et al.*, 2018). As EROS que apresentam elétrons desemparelhados, como o $O_2^{\circ-}$, possuem radicais livres muito instáveis assim como alta atividade oxidante (Cacciottola *et al.*, 2021). Em contrapartida, o H_2O_2 apresenta maior estabilidade e possui menos radicais livres reativos, porém, ele pode se espalhar entre as membranas celulares com facilidade, sendo mediador da sinalização celular (Cacciottola *et al.*, 2021; Caglayan *et al.*, 2017).

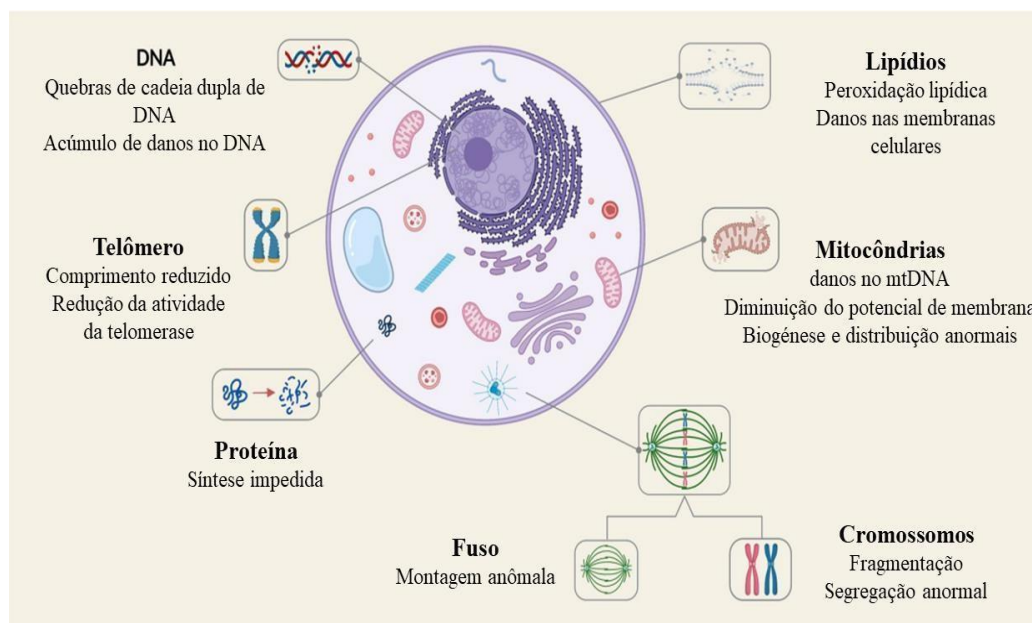
O aumento nos níveis de EROS causa estresse oxidativo (EO), que tem efeitos na qualidade dos oócitos e embriões (Li *et al.*, 2023; Terao *et al.*, 2019; Elmorsy *et al.*, 2017). O EO apresenta prejuízos às atividades celulares dos oócitos e das células da granulosa, consequentemente causando problemas relacionados à fertilidade feminina (Cacciottola *et al.*, 2021). O EO pode causar lesões nos ovários, como demonstrado na figura 2.

Figura 2 - Efeitos do estresse oxidativo aos vasos sanguíneos, ao interstício, aos folículos e ao corpo lúteo no ovário, e nos folículos causando danos aos oócitos, células da granulosa, células intersticiais do ovário e tecido folicular



Fonte: Adaptado de Yan *et al.*, (2022).

Ademais, nos sistemas *in vitro* alguns fatores como a exposição excessiva à luz, variação de temperatura, bem como um grande volume de meio de cultivo também estão associados ao EO (Soto-Heras, Paramio, 2020). Além dos danos ao ovário, a figura 3 apresenta danos intracelulares que podem ser causados por EO.

Figura 3 - Danos intracelulares do estresse oxidativo em oócitos

Fonte: Adaptado de Yan *et al.* (2022).

A geração de EROS, composta por H_2O_2 , $OH^\bullet$ e $O_2^{\bullet-}$ a partir de estressores endógenos que podem ser inflamação ou infecção, ou exógenos, podendo ser derivados de produtos químicos ou radiação UV, resultam na ativação do fator 2 relacionado ao fator nuclear eritroide (NRF2) (Krejlich E Birringer, 2022). Que por sua vez, é um fator de transcrição envolvido na regulação das respostas antioxidantes que atua protegendo as funções celulares (Yan *et al.*, 2022; Baird & Yamamoto, 2020). O NRF2 é um fator de transcrição primário que consiste em defender as células contra drogas e fitoquímicos, assim como protegê-las de EROS endógenas (Krejlich & Birringer, 2022). O NRF2 é, portanto, um citoprotetor que tem a função de controlar a transcrição das defesas antioxidantes e evitar danos oxidativos e inflamações (Sarawi *et al.*, 2022; Satta *et al.*, 2017).

Assim, para evitar maiores danos causados por EROS, antioxidantes podem ser incorporados aos meios de cultivo *in vitro*, eles podem ser classificados como antioxidantes enzimáticos, quando produzidos por células, ou antioxidantes não enzimáticos quando estes são obtidos por outras formas externas ao organismo (Silva *et al.*, 2022).

2.5 Compostos antioxidantes como suplementos de meio de cultivo de folículos pré-antrais

Os antioxidantes atuam neutralizando a ação dos radicais livres, os sistemas de defesa antioxidantes que as células possuem são classificados em enzimáticos e não

enzimáticos. Os mecanismos enzimáticos são os primeiros a agir, promovendo a quebra e remoção de EROS. As enzimas principais que se apresentam nesta categoria são: Catalase (CAT), a Glutathione Redutase (GR), a Glutathione Peroxidase (GPx) e Superóxido Dismutase (SOD), com potencial de quebrar o radical superóxido, hidroperóxidos e H_2O_2 e transformá-las em moléculas inofensivas como álcool e água (Steckiewicz *et al.*, 2019; Nimse e Pal, 2015).

Segundo Von Mengden *et al.* (2020) as enzimas SOD, CAT e GPx, participam do processo que se inicia com a quebra da glicose pelas células do cumulus gerando piruvato metabolizado no oócito por diferentes enzimas. A SOD, CAT e GPX são mais comuns e atuam desempenhando funções que são essenciais na remoção de oxigênio nocivo naturalmente produzidos pelas superóxidos dismutase (Wang *et al* 2017; Fridovich, 1995). As SODs atuam convertendo o $O_2^{\circ-}$ em H_2O_2 através da superóxido dismutase dependente de manganês (MnSOD) mitocondrial e superóxido dismutase de cobre e zinco (Cu/ZnSOD) citoplasmática, ao passo que a CAT e a GPx irão mediar a decomposição do H_2O_2 em água e oxigênio (Rakha *et al* 2022; Johnson *et al.*, 2005; Chelikani *et al.*, 2004).

A SOD é uma das primeiras enzimas a converter $O_2^{\circ-}$ em oxigênio e H_2O_2 , que será metabolizado pela enzima CAT ou pela GPx (Carrillo-González *et al.*, 2023). Das EROS a que mais apresenta prejuízos celulares, é o $O_2^{\circ-}$, que é removido pela SOD por meio de uma reação chamada de dismutação, sendo considerada uma das primeiras etapas a regular a produção de O_2 intracelular (Wang *et al* 2017). Existem alguns tipos de SOD que são expressos nos organismos naturalmente. A SOD1, ou Cu/Zn-SOD que está localizada no citoplasma e em compartimentos nucleares, a SOD2, ou Mn-SOD, que é expressa nas mitocôndrias, e a SOD3, ou EC-SOD, que é uma glicoproteína e se localiza no espaço extracelular (Wang *et al* 2017; Marklund, 1982; Marklund, Holme, & Hellner, 1982; Weisiger & Fridovich; 1973).

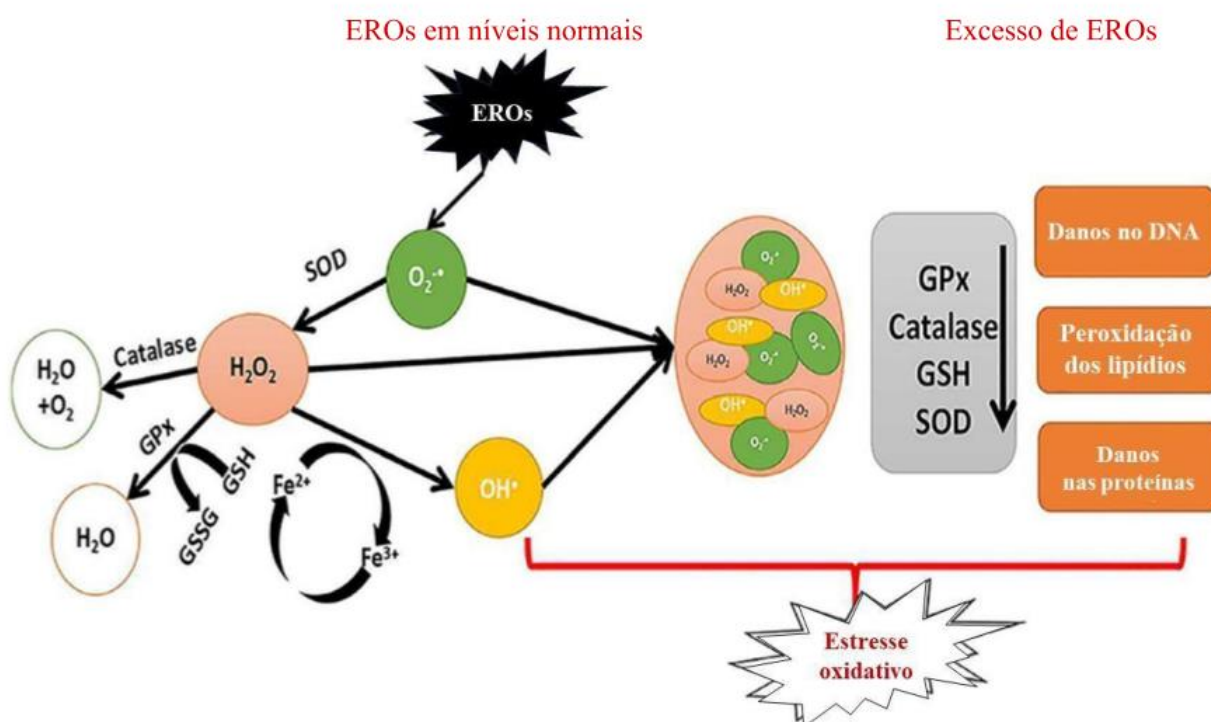
A CAT apresenta ação dependente de elevadas concentrações de H_2O_2 , quando isso não ocorre, ou há presença de um doador de hidrogênio como metanol, fenol ou etanol, a CAT irá agir removendo o H_2O_2 e promovendo oxidação deste substrato por meio de uma reação de peroxidação (Ali *et al.*, 2020). A CAT é também uma enzima antioxidante importante envolvida em processos reprodutivos, pois possui capacidade de proteger os oócitos da ação das EROS que são geradas a partir de processos fisiológicos, como esteroidogênese ovariana que apresenta alta eficácia catalítica (Khan *et al.*, 2020). A CAT é detectada somente pelos peroxissomos e pode catalisar o H_2O_2 em H_2O (Wang *et al* 2017; Chance, Sies, & Boveris, 1979).

O gene GPX codifica a produção da enzima glutathione peroxidase, e catalisa a reação de oxidação da glutathione em dissulfeto de glutathione utilizando H_2O_2 , e está presente

tanto nas mitocôndrias como no citoplasma (Wang *et al* 2017; Mills, 1957). Há alguns tipos de GPX conhecidos que são: a GPX1, que é a forma citosólica, a GPX-GI, uma forma gastrointestinal, a GPX-P, que é uma forma secretada no plasma, e a GPX-EP, secretada no epidídimo (Carrillo-González *et al.*, 2023).

Já os mecanismos não-enzimáticos irão incluir oligoelementos, como (cobre, zinco e selênio), vitaminas como as vitaminas C e E, caroteno e betacaroteno e outros produtos naturais (Silva *et al.*, 2023; Yan *et al.*, 2022). Os antioxidantes não enzimáticos também incluem tiois, melatonina e licopeno, que buscam evitar o dano oxidativo por meio da interrupção de reações em cadeia dos radicais livres (Rakha *et al.*, 2022; Chowdhury *et al.*, 2018; Zhao *et al.*, 2016; Takahashi, 2012; Changyong *et al.*, 2010; Schneider, 2005; Nishikimi & Yagi, 1996). A glutathiona (GSH) é considerada o principal representante dos antioxidantes não enzimáticos presentes em oócitos e embriões (Wang *et al.*, 2017). A figura 4 apresenta o mecanismo de defesa antioxidante contra os radicais livres de oxigênio.

Figura 4 - Mecanismos de defesa contra as espécies reativas de oxigênio



Fonte: Adaptado de Lu *et al.* (2018). H_2O , água, $+O_2$, oxigênio; H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; GPx, Glutathiona peroxidase; GSSG, glutathiona oxidada; GSH, glutathiona reduzida; SOD, superóxido dismutase; $O_2^{\cdot-}$, ânion superóxido; $OH^{\cdot}$, radical hidroxila; Fe^{2+} , Ferro II; Fe^{3+} , Ferro III; EROs, Espécies reativas de oxigênio;

Alguns antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico (Vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E), podem agir neutralizando os radicais livres por meio da doação ou

aceitação de elétrons. A vitamina C, é um excelente antioxidante natural solúvel em água, que pode proteger o sistema reprodutivo feminino, e aumentar a expressão de SOD, CAT e GSH-Px e reduzindo a peroxidação lipídica, pode também proteger a ultraestrutura mitocondrial e diminuir a apoptose (Yan *et al.*, 2022; He *et al.*, 2021; Gai *et al.*, 2017; Jhala, Chinoy & Rao, 2008). Já a vitamina E, é solúvel em gordura, e se apresenta como um importante antioxidante para funções reprodutivas, podendo aumentar a capacidade antioxidante do tecido ovariano, regular hormônios endócrinos e até reverter atresia folicular, e pode apresentar também relação com a proteção das funções ovarianas (Yan *et al.*, 2022; Sargazi *et al.*, 2019; Hassoun, Vodhanel & Abushaban, 2004; Duleba *et al.*, 2004).

Apenas a defesa antioxidante enzimática das células não suporta a quantidade de EROS que são produzidas durante o cultivo *in vitro*, por isso, torna-se necessária a suplementação dos meios de cultivo com outras substâncias adicionais, podendo ser incluídos albuminas, fatores de crescimento, hormônios, tampões, vitaminas e quelantes de metais pesados que também podem ser fontes de EROS durante o cultivo *in vitro* e manuseio, nesse sentido, a adição de antioxidantes, visa eliminar as EROS formadas durante o cultivo para tentar equilibrar a geração de EROS e o desenvolvimento de oócitos competentes (Vasconcelos *et al.*, 2021). Nos ovários, as EROS apresentam diversas funções como as relacionadas à maturação oocitária, ovulação, formação dos blastocistos, implantação, luteólise e manutenção lútea na gestação (Lu *et al.*, 2018). Além disso, estão envolvidas na regulação dos processos que envolvem o crescimento oocitário, meiose, ovulação e outros processos fisiológicos (Yan *et al.*, 2022; Agarwal *et al.*, 2008).

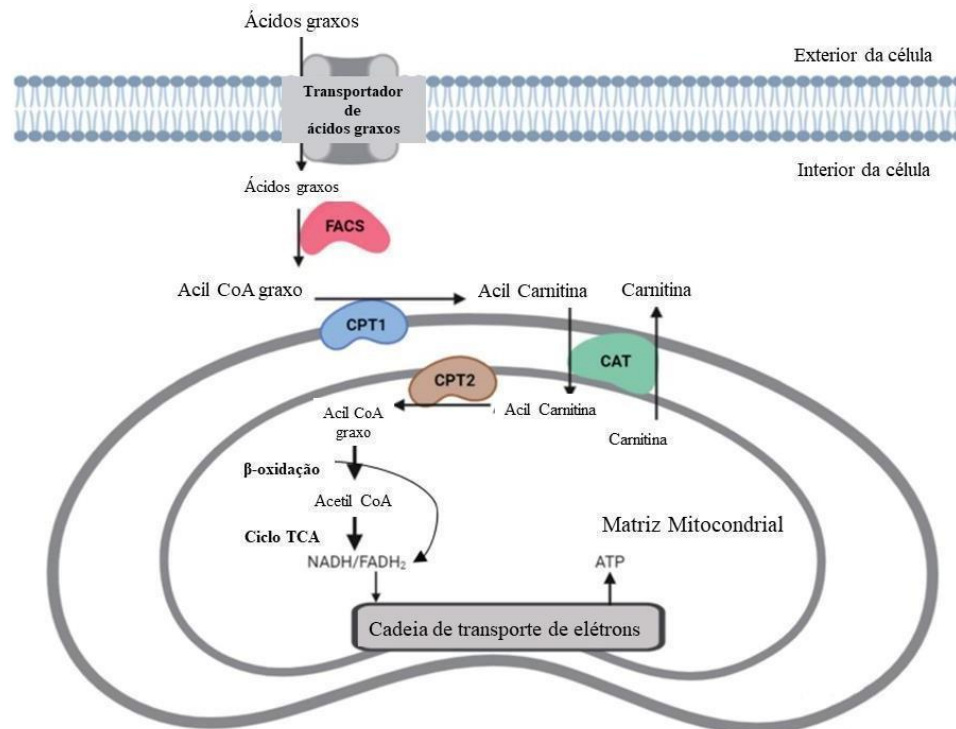
No cultivo *in vitro*, ocorre desequilíbrio na produção e eliminação das EROS, devido a manipulação, a concentração de O₂ inadequado das estufas, alterações de temperatura, luz e pressão durante as trocas de meio de cultivo, sendo indispensável a busca por baixos níveis de EROS para que as funções celulares aconteçam de forma adequada (Soto-Heras; Paramio, 2020). Algumas substâncias já são amplamente utilizadas nos meios de cultivo e têm demonstrado bons resultados, como o ácido ascórbico, transferrina e selênio (Paulino *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2018; Gouveia *et al.*, 2016; Santos; Schoevers; Roelen, 2014). Ainda assim, não suprem em níveis satisfatórios às necessidades dos meios de cultivo, por isso é importante a obtenção de novos compostos com ação antioxidante para auxiliar na eliminação ou diminuição do estresse oxidativo *in vitro* (Vasconcelos *et al.*, 2021; Barbe *et al.*, 2019).

2.6 Aspectos químicos e biológicos da L-carnitina

As carnitinas são substâncias hidrofílicas que desempenham funções importantes no transporte de ácidos graxos de cadeia longa para a β -oxidação dentro das mitocôndrias (Albogami, 2023; Longo *et al.*, 2006; Gülcin, 2006). A L-carnitina é a forma biologicamente ativa da carnitina (3-hidroxi-4-N-trimetilamino butirato, $C_7H_{15}NO_3$) (JIANG *et al.*, 2019), uma molécula que apresenta solubilidade em água (AGARWAL; SENGUPTA; DURAIRAJANAYAGAM, 2018), e ocorre naturalmente no organismo (Li *et al.*, 2023; Talenezhad *et al.*, 2020). Ela foi conhecida e isolada inicialmente no músculo bovino em 1905, e sua estrutura foi detalhada apenas após 22 anos, em 1927 (Szymański *et al.*, 2021; Peluso *et al.*, 2000; Kerner & Hoppel, 1998).

Apesar de ser distribuída amplamente na natureza, apenas cerca de 25% da L-carnitina endógena é sintetizada a partir de lisina e metionina e o restante precisa ser fornecido de outras formas (Szymański *et al.*, 2021; Kerner & Hoppel, 1998; Peluso *et al.*, 2000; Engel & Rebouche, 1984). Esse papel essencial na β -oxidação de ácidos graxos mitocondriais acontece como parte de um ciclo que tem como objetivo a transferência de ácidos graxos de cadeia longa para as mitocôndrias e para os peroxissomos (Palmerini *et al.*, 2023; Yang *et al.*, 2022).

Segundo Placidi *et al.* (2022), esse papel na oxidação mitocondrial de ácidos graxos de cadeia longa acontece de forma obrigatória e tem impactos na manutenção das demais funções mitocondriais. A oxidação de ácidos graxos tanto os de cadeia média (C_6 - C_{10}), como os de cadeia curta (C_4 - C_6), demonstraram ser independentes do transporte de carnitina, porém ela participa da translocação de grupos acetil do citoplasma até as mitocôndrias (Placidi *et al.*, 2022; Schrader *et al.*, 2015; Violante *et al.*, 2013). Na figura 5 está descrita como ocorre a oxidação de ácidos graxos.

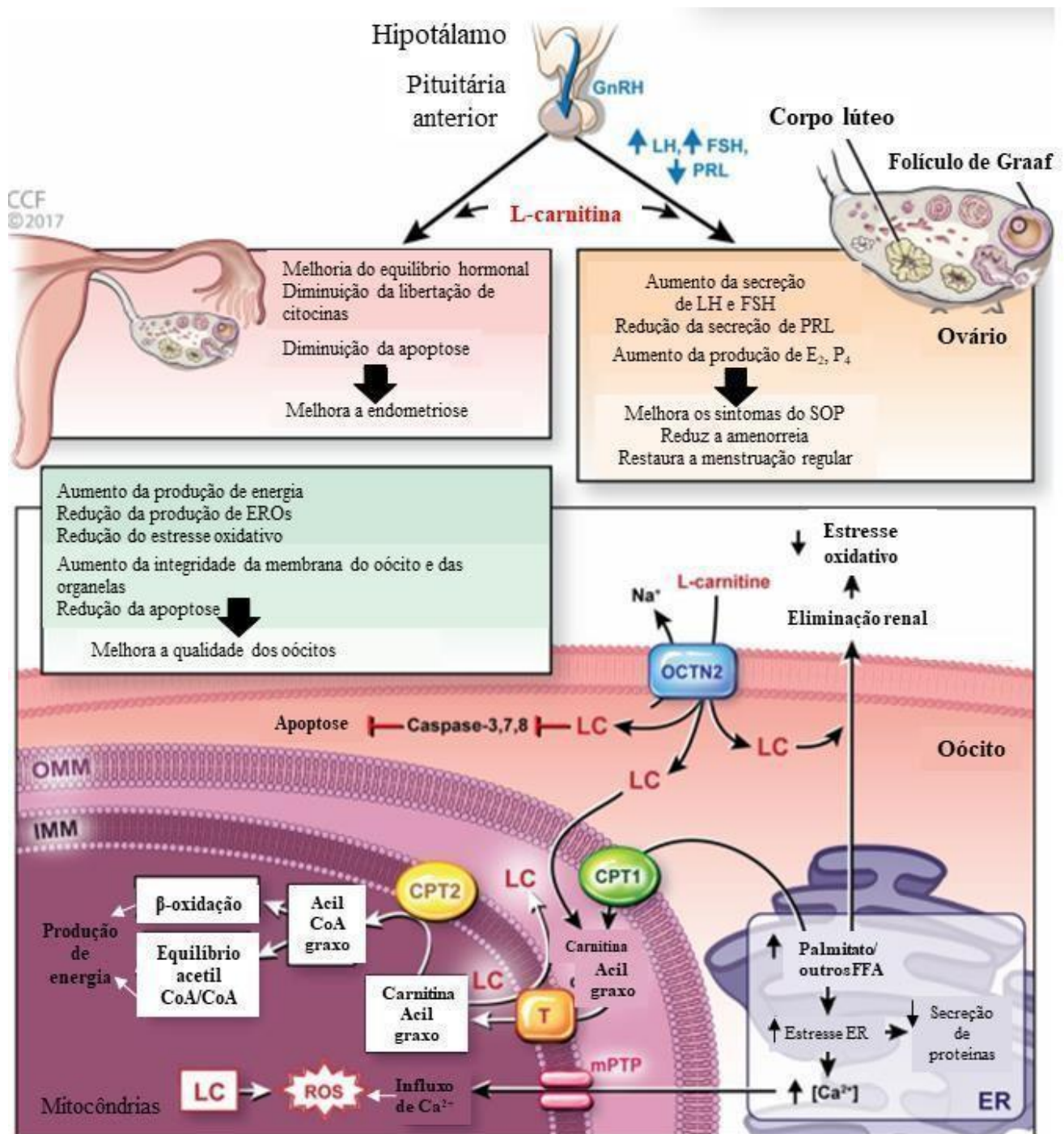
Figura 5 - Oxidação de ácidos graxos

Fonte: Adaptado de Carrillo-González *et al.* (2023). FACS, Acil-CoA graxo sintase; CPT1, Carnitina Palmitoil Transferase 1; CPT2, Carnitina Palmitoil Transferase 2; CAT, catalase; ATP, adenosina trifosfato.

Foi observado que a L-carnitina potencializa o fornecimento de energia das células. Com esse propósito, a L-carnitina foi usada preferencialmente por apresentar mecanismo com ações integradas na redução do estresse das células, mantendo equilíbrio hormonal e aumentando a produção de energia (Agarwal; Sengupta; Durairajanayagam, 2018).

A L-carnitina entra no oócito por meio do receptor transportador de cátions orgânicos novel 2 (OCTN2) (figura 6) e por sua ação direta na qualidade do oócito, é capaz de aumentar a produção de energia pela β -oxidação, eliminando excesso de palmitato do retículo endoplasmático (RE) o que levaria a redução do estresse do RE, ao passo que elimina também radicais livres reduzindo EO e inibindo caspases e assim, prevenindo a apoptose celular (Agarwal; Sengupta; Durairajanayagam, 2018). A figura 6 apresenta os mecanismos de ação já conhecidos da L-carnitina.

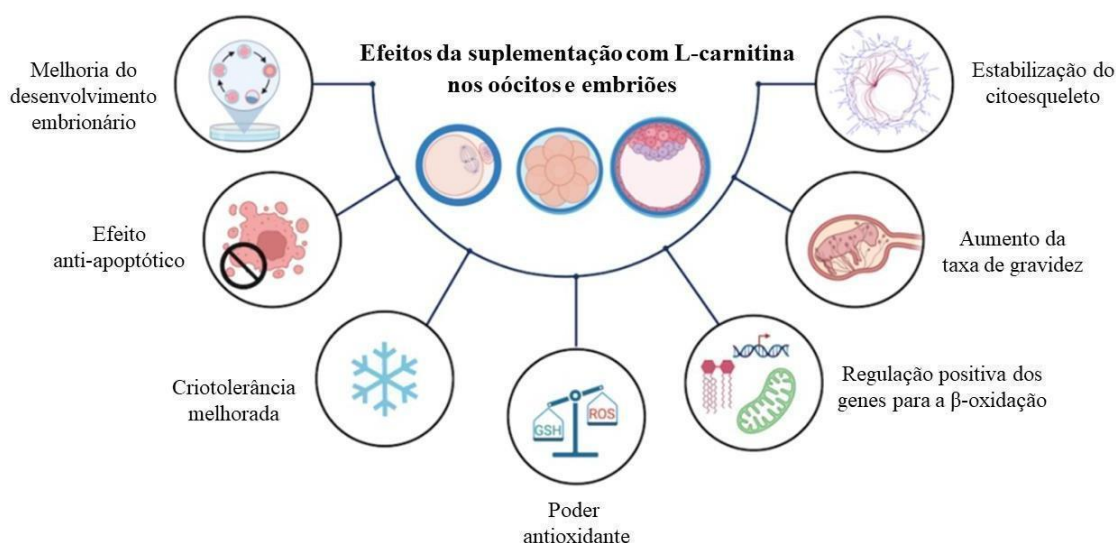
Figura 6 - Mecanismo de ação da L-carnitina



Fonte: Adaptado de Agarwal, Sengupta e Durairajanayagam (2018). GnRH, hormônio liberador de gonadotrofinas; LH, hormônio luteinizante; FSH, hormônio folículo estimulante; PRL, prolactina; E², estradiol; P₄, progesterona; SOP, síndrome dos ovários policísticos; Na⁺, íons sódio; OCTN2, transportador de cátions orgânicos novel 2; LC, L-carnitina; CPT1, carnitina palmitoiltransferase I; CPT2, carnitina palmitoiltransferase II; FFA, ácido graxo livre; IMM, membrana mitocondrial interna; OMM, membrana mitocondrial externa; T, translocase; mPTP, poro de transição de permeabilidade mitocondrial; ROS, espécies reativas de oxigênio; ER, retículo endoplasmático; Ca²⁺, íons de cálcio.

Na produção *in vitro* de embriões bovinos a utilização da L-carnitina no meio de cultivo melhorou a criotolerância, mas não teve efeito na taxa de prenhez por transferência após transferência de embriões descongelados (Zolini *et al.*, 2019). A L-Carnitina também apresenta capacidade de aumentar a atividade mitocondrial desempenhando um papel de transportador de ácidos graxos em células como oócitos na espécie bovina e outras células (Carrillo-Gonzalez *et al.*, 2019). De acordo com Gonzalez (2019), quando o meio de Maturação *In Vitro* (MIV) foi suplementado com L-carnitina houve melhora na expansão do cumulus e aumento na atividade mitocondrial, mas não apresentou efeito aparente para clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos. Além de melhora significativa do potencial do embrião de MIV para desenvolver gestações viáveis, relatando taxas de gravidez melhoradas em bovinos (Carrillo-González *et al.*, 2020). A figura 7 apresenta alguns efeitos que a suplementação de L-Carnitina já demonstrou em oócitos e embriões.

Figura 7 - efeitos da L-Carnitina durante o cultivo de oócitos e embriões



Fonte: Adaptado de Placidi *et al.* (2022).

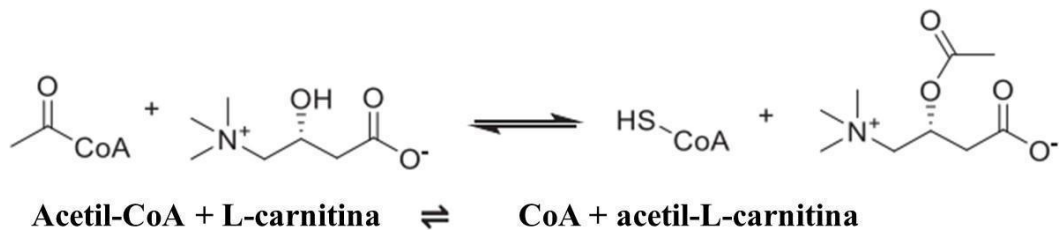
Existem, no entanto, algumas formas de carnitina, e o pool de carnitina endógena em mamíferos, inclui a L-carnitina não esterificada e outros ésteres (acilcarnitinas), podendo ser de cadeia longa como o palmitoil-L-carnitina, cadeia média, como o octanoil-L-carnitina e cadeia curta como a acetil-L-carnitina, e a propionil-L-carnitina (Placidi *et al.*, 2022). Dessas formas apresentadas, a acetil-L-carnitina tem recebido grande atenção devido às suas importantes propriedades (Albogami, 2023).

2.7 Acetil-L-Carnitina no metabolismo de lipídios

A L-Carnitina já vem sendo bastante conhecida por sua capacidade de transportar ácidos graxos esterificados via membranas mitocondriais para que ocorra a β -oxidação. Foi observado que a L-Carnitina retorna ao citoplasma na forma de Acetil-L-Carnitina para modificação pós-traducional de proteínas e biossíntese de lipídios (Hsu *et al.*, 2023).

A Acetil-L-Carnitina (ácido 3-hidroxi-4-N-trinetilaminobutírico), é um derivado natural da carnitina que é distribuído amplamente nos tecidos dos mamíferos (Wang *et al.*, 2020). Quando adicionado à dieta, pode reverter alterações relacionadas à idade na taxa metabólica, em perfis de ácidos graxos e já demonstrou proteção em relação ao EO (Wang *et al.*, 2020; Calabrese *et al.*, 2005; Boerrigter *et al.*, 1993). A Acetil-L-Carnitina faz parte da família de acilcarnitinas que conta com cerca de 40 ésteres, e acredita-se ser este o mais abundante (Placidi *et al.*, 2022). Há uma enzima chamada Acetil-L-Carnitina transferase, que é responsável por sintetizar a Acetil-L-Carnitina no organismo (Sepand *et al.*, 2015; Chan & Shea, 2007).

As funções biológicas da Acetil-L-Carnitina sofrem interferência dos efeitos metabólicos e dos componentes acetil e carnitina, partes fundamentais para diversos processos metabólicos e intracelulares, como o transporte de ácidos graxos para as mitocôndrias, diminuição da concentração de lipídios séricos e até a promoção da estabilidade das membranas celulares, seu grupamento acetil também pode ser responsável por manter os níveis de acetil-Coenzima A (Albogami, 2023; Adeva-Andany *et al.*, 2017; Pettegrew *et al.*, 2000). As reações de transacilação Coenzima A: Carnitina são catalisadas pelas enzimas carnitina acetiltransferase (CRAT) e carnitina palmitoiltransferase (CPT) (Hsu *et al.*, 2023; Longo *et al.*, 2016; Hoppel, 2003; McGarry & Brown, 1997). Além da CRAT e CPT, a família de carnitina aciltransferases também conta com a octanoiltransferase de cadeia média (CROT) e a palmitoiltransferase de cadeia longa (CPT2) (Hsu *et al.*, 2023). Na figura 8 é apresentada a reação da carnitina acetiltransferase, e como ocorre essa conversão.

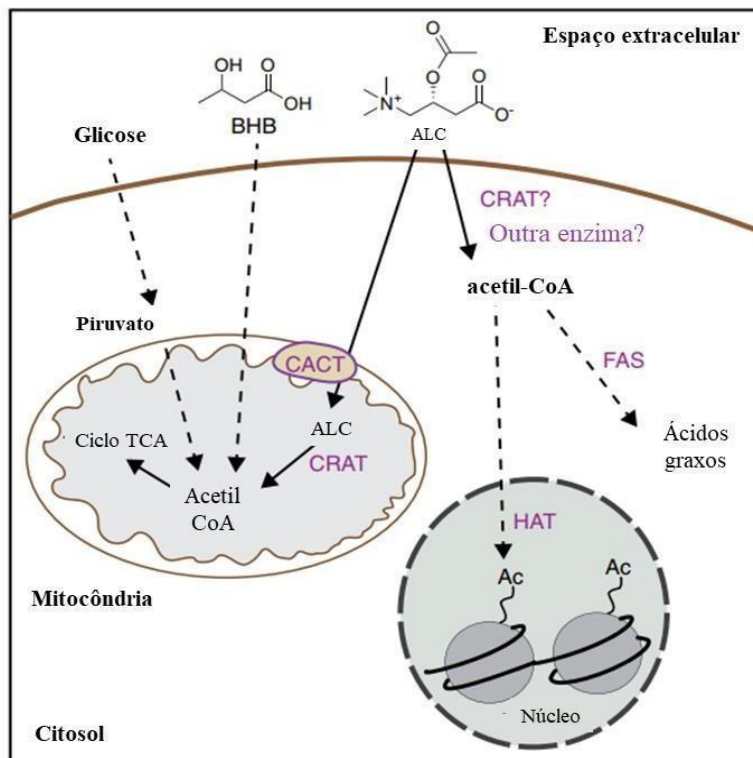
Figura 8 - Reação da carnitina acetiltransferase

Fonte: Adaptado de Hsu *et al.* (2023). O, Oxigênio; CoA, Coenzima A; N⁺, cátion nitrogênio; OH, hidroxila; O⁻, ânion oxigênio; HS-CoA, Forma da Coenzima A;

Alguns estudos mostram um importante papel que a Acetil-L-Carnitina desempenha na oxidação mitocondrial de ácidos graxos e produção de energia celular, por meio de interação com a membrana mitocondrial (Mohammad-Bagher *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2015). Já foi sugerido que existe a possibilidade de haver redução nos níveis citosólicos de citocromo C e ativação da caspase-3 por ação da Acetil-L-Carnitina (Mohammad- Bagher *et al.*, 2019; Di Cesare *et al.*, 2007). Outros estudos apontam o potencial antiapoptótico, anti-inflamatório, citoprotetor e neuroprotetor da Acetil-L-Carnitina (Sepand *et al.*, 2015; Chan & Shea, 2007; Nalecz *et al.*, 2004).

De acordo com Hsu *et al.* (2023), possivelmente a Acetil-L-Carnitina exógena é levada para o citosol pelas células, por meio do transportador de carnitina OCTN2, que converte L-carnitina em Acetil-CoA através da carnitina aciltransferase CRAT (Hsu *et al.*, 2023; Juraszek & Nałecz, 2019). Dessa forma, os autores propuseram uma utilização no metabolismo central para a Acetil-L-Carnitina exógena, como mostrado na figura 9.

Figura 9 - Proposta de utilização da Acetil-L-Carnitina exógena no metabolismo central



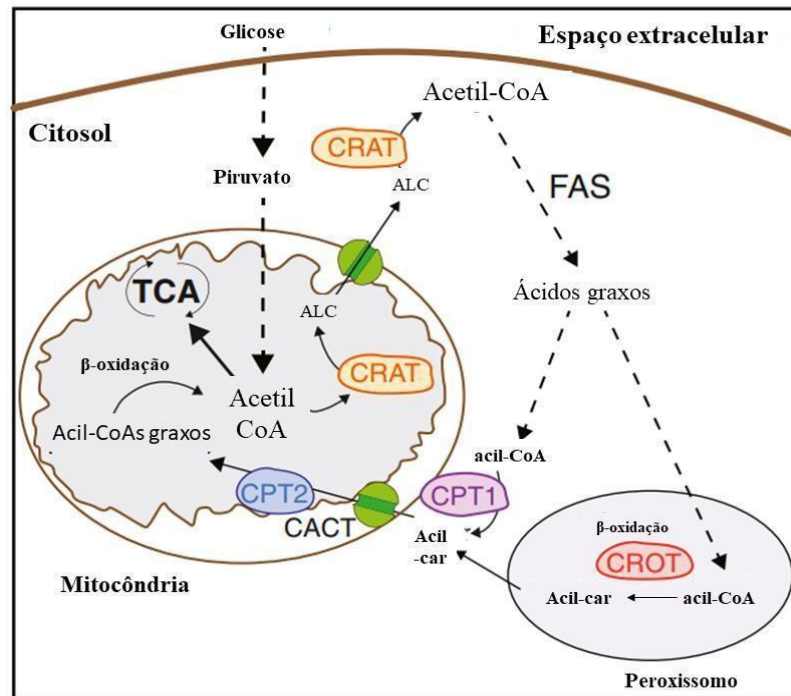
Fonte: Adaptado de Hsu *et al.* (2023). OH, hidroxila; O, oxigênio; BHB, β-hidroxibutirato; ALC, acetil-L-carnitina; N⁺, cátion nitrogênio; O⁻, ânion oxigênio; CRAT, carnitina acetiltransferase; FAS, Ácido graxo sintase; HAT, Histona acetiltransferase; Ciclo TCA, Ciclo do ácido tricarboxílico.

Além de sua ação estabilizadora na membrana mitocondrial, estudos relatam a participação da Acetil-L-Carnitina na translocação de unidades de acetil através de membranas mitocondriais tanto nas vias anabólicas como catabólicas, atuando como regulador energético e de processos metabólicos e apresentando função de eliminador comum de radicais livres (Albogami, 2023; Pan *et al.*, 2022; Baci *et al.*, 2019; Ames, 2004). É nas mitocôndrias que a Acetil-L-Carnitina assegura a disponibilidade de acetil-coenzima A promovendo a eliminação de subprodutos tóxicos (Momenzadeh *et al.*, 2023). De acordo com Emídio *et al.* (2020), quando administrada de forma exógena, a Acetil-L-Carnitina apresenta maior biodisponibilidade em comparação com a L-Carnitina.

A acetil-L-carnitina é um substrato pronto para ser incorporado ao ciclo de Krebs e, da mesma forma que a L-carnitina, é capaz de estabilizar as membranas celulares e facilitar a incorporação de fosfolipídios (Szymański *et al.*, 2021; Cavallini *et al.*, 2004). De acordo com Tauqir *et al.* (2021), ela facilita o transporte de ácidos graxos livres do citosol da célula até as mitocôndrias, para que aconteça a β-oxidação e consequente a produção de energia. Já demonstrou possuir também importante efeito no metabolismo da glicose, na estabilização de

organelas, proteção de células contra apoptose, estresse oxidativo, além da produção de energia (Tauqir *et al.*, 2021; Abd-Elfattah *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2004; Ishii *et al.*, 2000). Na figura 10 é demonstrado como ocorre a distribuição de aciltransferases e como ela pode facilitar o metabolismo de ácidos graxos com a utilização de Acetil-L-Carnitina (Hsu *et al.*, 2023).

Figura 10 - Distribuição celular de carnitina aciltransferase na facilitação do metabolismo de ácidos graxos



Fonte: Adaptado de Hsu *et al.*, (2023). CRAT, carnitina acetiltransferase; ALC, acetil-L-carnitina; FAS, ácido graxo sintase; TCA, Ciclo do ácido tricarboxílico; CPT1, carnitina palmitoiltransferase I; CPT2, carnitina palmitoiltransferase II.

Foi relatado que tanto a L-Carnitina como seus derivados acil apresentam potenciais efeitos antioxidantes (Koohpeyma *et al.*, 2021; Calò *et al.*, 2006).

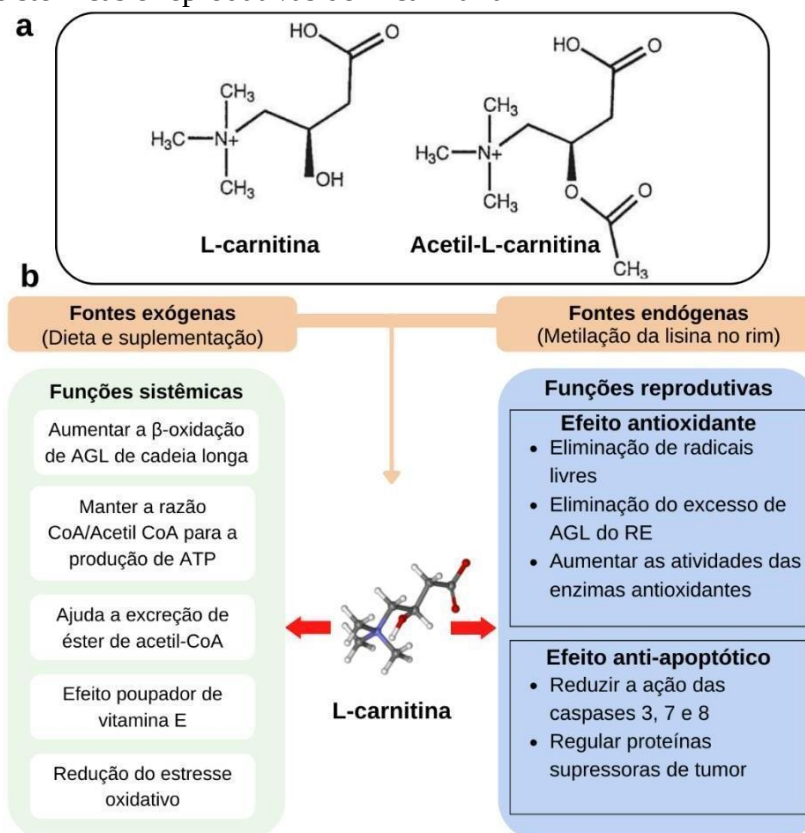
2.8 Potencial antioxidante da L-carnitina e Acetil-L-Carnitina

As carnitinas já apresentaram eficácia na prevenção do acúmulo de produtos relacionados à peroxidação lipídica, pelos seus efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios (Fathizadeh *et al.*, 2020; Dokmeci *et al.*, 2005). Li *et al.* (2023) demonstram que a L- Carnitina apresenta altos efeitos antioxidantes, exercendo efeitos protetores na reprodução feminina, podendo ser capaz de reduzir danos aos oócitos relacionados a produtos de estresse oxidativo, derivado da produção em excesso das EROS (Li *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2021; Agarwal *et al.*, 2018).

Foi observado também em tratamento com L-Carnitina, que ela foi capaz de reduzir estresse oxidativo nas células da granulosa de humanos induzidas por H₂O₂, diminuindo a apoptose das células da granulosa, podendo exercer um efeito protetor e garantir um melhor suporte nutricional aos oócitos o que sugere uma melhoria na qualidade dos folículos (Li *et al.*, 2023).

Em tratamento com L-Carnitina foi observada a elevação *in vivo* dos níveis de carnitina e acilcarnitina em células humanas (Albogami, 2023). Em estudo realizado em mulheres tanto com L-carnitina como acetil-L-carnitina, relevantes resultados em relação a capacidades em relação ao metabolismo do sistema reprodutivo, como para regulação do estresse oxidativo, podendo ser utilizados sozinhos, ou em combinação com outra substância que também apresente potencial antioxidante (Agarwal; Sengupta; Durairajanayagam, 2018), apresentando funções sistêmicas e funções reprodutivas (Figura 11).

Figura 11 - (a) Estruturas moleculares de L-carnitina e acetil-L-carnitina, (b) funções sistêmicas e reprodutivas de L-carnitina



Fonte: Adaptado de Agarwal, Sengupta e Durairajanayagam (2018). CoA, coenzima A; ER, Retículo endoplasmático; AGL, ácido graxo livre, H₃C, metanol; CH₃, metil; N⁺, ânion nitrogênio; OH, hidroxila.

A Acetil-L-Carnitina possui funcionalidades semelhantes às da L-Carnitina, e demonstrou regular de forma negativa os níveis de formação das EROS, e assim, foi possível perceber que auxiliou no alívio de danos relacionados ao H₂O₂ (Qian *et al.*, 2021; Shafiei *et al.*, 2020; Bodaghi-Namileh *et al.*, 2018; Ye *et al.*, 2010). Resultados importantes também foram encontrados em relação a atividade da carnitina palmitoiltransferase I e II do fígado de murinos, e os níveis séricos de carnitina e acetil-carnitina, diminuíram de forma significativa (Albogami, 2023; Liu *et al.*, 2011).

Alguns estudos já apresentaram que a Acetil-L-Carnitina demonstrou ter um potencial antioxidante poderoso, absorvendo EROS nos tecidos, e apresentando também características anticancerígenas (Albogami, 2023; Wang *et al.*, 2021; Peluso *et al.*, 2000). Estudos supõem que após o uso da Acetil-L-Carnitina houve um aumento da respiração celular e da apoptose, e ao mesmo tempo uma diminuição da proliferação celular e da inflamação nas células cancerígenas (Albogami, 2023; Dunning *et al.*, 2014; You *et al.*, 2012).

A acetil-L-carnitina quando em administração oral em camundongos, mostrou aliviar disfunções ovarianas associadas à SOP, com mecanismos moleculares subjacentes a esses efeitos incluindo a atividade antioxidante e glicativa além de potencialização das mitocôndrias (Di Emidio *et al.*, 2020). Em outro aspecto reprodutivo, na MIV, a acetil-L-carnitina em búfalas apresentou melhorias na criotolerância devido a mudanças na função mitocondrial e no perfil lipídico da membrana (Xu *et al.*, 2019).

Segundo Gardner (2020), com a utilização de acetil-L-carnitina o estresse oxidativo ainda ocorre nas células, embora possa ser reduzido em comparação com os níveis atmosféricos de oxigênio. Vários estudos mostram benefícios quanto a utilização da L-carnitina e acetil-L-carnitina e seu potencial antioxidante, sugerindo que pode ajudar a controlar as EROS quando adicionada aos meios de cultivo, no entanto, no cultivo *in vitro* de tecidos e folículos secundários bovinos ainda são desconhecidos seus efeitos, dessa forma, é de grande importância estudos sobre a influência de diferentes concentrações de acetil-L-carnitina no desenvolvimento de folículos ovarianos bovinos em tecido ovariano e sobre o crescimento de folículos secundários cultivados *in vitro*.

CAPÍTULO I

L-carnitine and the control of oxidative stress during *in vitro* ovarian follicular growth, oocyte maturation, embryonic development and cryopreservation

L-carnitine and the control of oxidative stress during *in vitro* ovarian follicular growth, oocyte maturation, embryonic development and cryopreservation

Allana M.F. Leitão¹; Bianca R. Silva¹; Efigênia C. Barbalho¹; Lais R. F. M. Paulino¹;
Francisco C. Costa¹; Fabrício S. Martins¹; José R.V. Silva¹

¹Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceara, Av. Comandante Maurocêlio Rocha Ponte 100, postal code 62041-040, Sobral, CE, Brazil. *Corresponding author: jrvsilva@ufc.br

Abstract

L-carnitine is a candidate to regulate oxidative stress and lipid β -oxidation during *in vitro* culture and cryopreservation of ovarian follicles and embryos. In oocytes and follicles cultured *in vitro*, L-carnitine plays a significant role in the endoplasmic reticulum, mitochondria and also in ooplasm, balancing the acetyl-CoA/CoA ratio, maintaining glucose metabolism, increasing energy production and transferring the palmitate concentration to the mitochondria or eliminating it from where it can cause oocyte lipotoxicity by oxidative stress. L-carnitine further increases the proportion of mature oocytes with uniform mitochondrial distribution in mice and pigs during *in vitro* culture. During *in vitro* culture of embryos, L-carnitine eliminates reactive oxygen species and improves post-thaw cryotolerance. Therefore, L-carnitine plays an important role to control lipid peroxidation and oxidative stress during *in vitro* culture of ovarian follicles, oocyte maturation, embryonic development and their cryopreservation.

Key-words: *in vitro* culture; L-carnitine; embryo; oocyte; cryopreservation.

Introduction

The improvement of *in vitro* culture systems for ovarian follicles, oocytes and embryos is of great relevance to increase *in vitro* production of embryos. However, lipid peroxidation and imbalance in the production and elimination of reactive oxygen species (ROS) during *in vitro* culture represent the main barriers to be overcome (Soto-Heras & Paramio, 2020). In this sense, several studies have sought to develop strategies for the development of efficient culture media with the addition of substances to control the damages caused by excess of ROS (Paulino *et al.*, 2022).

L-carnitine is a water-soluble vitamin-like quaternary ammonium compound that is naturally produced and synthesized primarily from lysine and methionine in the liver to generate metabolic energy while lipid breakdown occurs (Modak *et al.*, 2022). There is, however, an endogenous carnitine pool formed by the short-chain carnitine esters, i.e., acetyl-L-carnitine and propionyl-L-carnitine which, when administered exogenously, have a higher bioavailability compared to L-carnitine. Acetyl-L-carnitine is the primary ester of L-carnitine, exhibits antioxidant effects and has beneficial effects on reproductive functions (Agarwal *et al.*, 2018; Aliabadi *et al.*, 2012; Cheng & Chen, 2008; Liu *et al.*, 2004).

According to Carrillo-González *et al.* (2023), lipids are the most abundant reservoir of energy in bovine embryos, and triacylglycerol containing lipid droplets represent the main stocks of fatty acids. The same authors showed that L-carnitine is a cofactor that facilitates the mobilization of fatty acids present in the oocyte cytoplasm to the mitochondria, which facilitate β -oxidation and generation of energy.

This review aims to discuss the influence of L-carnitine on lipid β -oxidation and oxidative stress during *in vitro* culture of ovarian follicles, oocyte maturation, embryo development and cryopreservation.

1.1 Oxidative stress *in vivo* and *in vitro*

Free radicals are chemical specimens that have at least one unpaired electron in their outer orbitals, being highly reactive (Prevedello & Comachio, 2021). This characteristic enables the transfer of electrons between neighboring molecules, allowing changes in the molecular environment to occur (Ferreira *et al.*, 2020). They constitute three classes: ROS, reactive sulfur species (RES) and reactive nitrogen species (RNS) (Martelli & Nunes, 2014).

The ROS are more relevant because they are naturally produced by the cellular metabolism of organisms, and play an important physiological role, being involved in several processes, such as energy production, phagocytosis, regulation of cell growth, intercellular signaling, immunity and cell defense, and synthesis of biological substances (Prevedello & Comachio, 2021). However, when ROS production exceeds its degradation, it causes oxidative stress, being responsible for various damages to DNA, proteins, and phospholipids of different cell types, favoring the appearance of degenerative diseases (Simas *et al.*, 2019). Controlling the production and neutralization of ROS is crucial for maintaining cell integrity. *In vivo*, this control is maintained through enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems. The enzymatic antioxidant system is composed of antioxidant enzymes, including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxiredoxins (PRDX) and the glutathione reductase/peroxidase (GPX) system (Souza *et al.*, 2020), which are capable of inactivating the harmful effects of free radicals in the body. The non-enzymatic system includes low molecular weight compounds such as L-carnitine, ascorbic acid, tocopherol, selenium, zinc, taurine, hypotaurine, carotene, lipoic acid and other thiol compounds such as cystine, cysteine, cysteamine and beta-mercaptoethanol (Crocomo, Marques Filho, Alvarenga, & Bicudo, 2012).

During *in vitro* culture, the reduction of endogenous antioxidant protection linked to other factors, such as exposure to light and high concentrations of oxygen, favors a significant increase in ROS production (Alves *et al.*, 2019; Sadeesh *et al.*, 2014), consequently inducing oxidative stress, which has been reported as one of the main limitations of *in vitro* culture and impairment of cell development (Del Collado *et al.*, 2017; Soto-Heras & Paramio, 2020). In excess, oxidative stress in granulosa cells results in follicular atresia (Saeed-Zidane *et al.*, 2017) and has been reported as one of the main factors associated with poor quality of cultured ovarian follicles (Paulino *et al.*, 2022; Sá *et al.*, 2018). Due to damages caused by oxidative stress *in vitro*, several studies have sought to develop protocols that can reduce oxidative stress *in vitro* (Cordeiro *et al.*, 2022; Nascimento *et al.*, 2022). L-carnitine is a candidate to regulate oxidative stress and lipid β -oxidation in cultured cells.

1.2 Mechanism of action of L-carnitine

Supplementation of culture medium with L-carnitine and its primary ester has shown benefits due to its direct effects against oxidative stress, in order to minimize cell death by apoptosis and maintain cellular energy (Agarwal *et al.*, 2018; Abdelrazik *et al.*, 2009; Infante *et al.*, 2002; Vanella *et al.*, 2000). In indirect effects *in vivo*, they affect the hypothalamus-pituitary gonad (HPG) axis, promoting secretion of the reproductive hormone. L-carnitine increases gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion from the hypothalamus causing K⁺-induced depolarization in hypothalamic neuronal cells to increase secretory activity (Agarwal *et al.*, 2018; Krsmanovic, *et al.*, 1994). It has also been reported that L-carnitine can increase serum levels of other reproductive hormones such as estradiol, progesterone, and luteinizing hormone (LH) and decrease prolactin in the usual way with different stages of estrus in animals' activity (Agarwal *et al.*, 2018; Genazzani *et al.*, 2011; Krsmanovic *et al.*, 1992). Figure 1 shows the direct and indirect effects of L-carnitine on the female reproductive system of mammals.

L-carnitine can also be used in combination with other antioxidant groups already commonly used to quench free radicals such as: vitamins (C, E and β -carotene), some metalloenzymes, including GPx (containing selenium), CAT (containing iron), SOD (containing copper, manganese and zinc) (Nimse & Pal, 2015). Thus, due to its energy generation property combined with its antioxidant property, L-carnitine has been studied for use in reproductive technologies including *in vitro* culture of ovarian follicles, *in vitro* maturation, *in vitro* embryo production and cryopreservation.

1.3 Effects of L-carnitine on *in vitro* follicular development and oocyte maturation

In cumulus-oocyte complexes (COCs) cultured *in vitro*, L-carnitine acts by transferring fatty acids to the mitochondria and facilitating β -oxidation, since lipid metabolism is one of the main regulators of oocyte maturation (Agarwal *et al.*, 2018; Dunning *et al.*, 2010; Stojkovic *et al.*, 2001). Within the oocyte, L-carnitine plays a significant role in the endoplasmic reticulum (ER), mitochondria and in the ooplasm. In the mitochondria, L-carnitine is converted to acetyl-L-carnitine and balances the acetyl-CoA/CoA ratio to maintain glucose metabolism through the cycle tricarboxylic acid (TCA), resulting in increased energy production (Agarwal *et al.*, 2018; Infante *et al.*, 2002). L-carnitine helps to minimize the concentration of pyruvate

that prevents entry into the TCA to reduce energy production. In mitochondria, L-carnitine transports palmitate and other long-chain fatty acids to facilitate their utilization through β -oxidation (Dunning *et al.*, 2010). In the ER, it decreases the concentration of palmitate by transferring it to the mitochondria or by eliminating it from where it can cause oocyte lipotoxicity by oxidative stress (Agarwal *et al.*, 2018).

The role of L-carnitine in follicular growth *in vitro* is still little explored. Dunning & Robker (2011) reported that L-carnitine did not alter survival, growth or differentiation of mouse secondary follicles *in vitro*. However, it significantly increased beta-oxidation and markedly improved fertilization rate and blastocyst development. In oocytes, L-carnitine has already been shown to be potentially efficient in different species. Hashimoto *et al.* (2008) reported that L-carnitine supports *in vitro* oocyte maturation and pig embryonic development. L-carnitine increases the proportion of mature oocytes with uniform mitochondrial distribution in mice and pigs during *in vitro* maturation (Zare *et al.*, 2015; Somfai *et al.*, 2011). Chankitisakul *et al.* (2013) showed that the presence of L-carnitine during *in vitro* maturation and subsequent vitrification of oocytes improves the rate of production of bovine embryos. Recently, Modak *et al.* (2022) reported the effects of L-carnitine during *in vitro* culture of buffalo oocyte granulosa complex (OGC) and showed that L-carnitine increased the rate of nuclear maturation up to metaphase II (MII) stage, decreased the rate of degeneration and even promoted the formation of structures similar to the antrum of OGC. Similar results were reported by Marin *et al.* (2020), in which L-carnitine increased oocyte competence during buffalo oocyte maturation in the absence of fetal bovine serum (FBS).

In mouse oocytes was reported by L-carnitine acts through the electrogenic force of voltage-gated Na^+ channels and it is transported by Na^+ / organic cationic transporter-2 (OCTN-2) to oocytes (Dunning & Robker 2012; Infante *et al.* 2002). In the oocyte, L-carnitine is converted to acetyl-L-carnitine by carnitine palmitoyltransferase-I (CPT-I) in the outer mitochondrial membrane, where act on the endoplasmic reticulum, mitochondria and even in ooplasm (Mingorance *et al.*, 2011). That way, L-carnitine optimizes glucose metabolism and the use of fatty acids for β -oxidation during energy production and thus prevents the excessive production of ROS.

In vivo, in women with polycystic ovary syndrome (PCOS), L-carnitine can stabilize the mitochondrial membrane and protect DNA against ROS-induced damage (Mohd *et al.*, 2022; Ismail *et al.*, 2014; Fenkci, *et al.*, 2008). Using a mouse model of PCOS, oral administration of acyl-L-carnitine alleviates ovarian dysfunction associated with this syndrome

rate and resultant porcine blastocysts. Supplementation of L-carnitine to bovine embryo culture medium has been shown to scavenge ROS within two-cell stage embryos (Takahashi *et al.*, 2013).

1.5 Effects of L-carnitine on cryopreservation of ovarian follicles, oocytes and embryos

While cryopreservation is largely seen as a safe and reliable procedure for the preservation of gametes and embryos (Sekhon *et al.*, 2018), the cells can still be seriously damaged during cryopreservation (Truong, *et al.*, 2022; Spijkers *et al.*, 2017; Barsky *et al.*, 2016; Beyer & Griesinger, 2016). *In vitro*, follicles, oocytes and embryos are more sensitive to cryopreservation compared to their *in vivo*-derived counterparts (Vining, *et al.*, 2021). Exposure to high concentrations of cryoprotectants, osmolarity and rapid temperature changes during cryopreservation have been shown to affect gamete and embryo physiology (Somoskoi *et al.*, 2015; Dalcin *et al.*, 2013) and their gene expression (Sahraei *et al.*, 2018; Monzo *et al.*, 2012). These deleterious effects are strongly associated with the occurrence of oxidative stress during cryopreservation.

Production of ROS during vitrification of gametes may be a crucial mediator of damage to proteins and DNA (Costa *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2020). Disturbances in the oxidative metabolism and damage in the cell membranes are other important stress factors related to vitrification. Together, these effects decrease glutathione (GSH) levels, alter expression of regulatory genes and are associated with decreasing maturation rate and developmental competence of follicles, oocytes and embryos after cryopreservation (Berteli *et al.*, 2022; Zare *et al.*, 2022; Costa *et al.*, 2021; Wu *et al.*, 2019; Pan *et al.*, 2018). Furthermore, cryopreservation of oocytes or embryos has been reported to cause mitochondrial dysfunction such as changes in membrane potential, and reduced ATP production (Gualtieri *et al.*, 2021; Iwata, 2021). However, the detrimental effects of cumulative stress have been shown to be partly ameliorated through the addition of antioxidants in vitrification media, such as L-carnitine.

Some reports have already demonstrated that L-carnitine plays an important role in attenuating the deleterious effects of oxidative stress on cryopreserved follicles. For instance, Zhang *et al.* (2015) observed lower rates of apoptosis and malondialdehyde (MDA) and higher levels of estradiol in mice ovarian follicles cryopreserved *in situ* and subsequently grafted. These results were translated into increased survival and follicular function. Zolini *et al.* (2019)

demonstrated that the addition of L-carnitine in culture medium improved post thaw cryotolerance but had no effect on pregnancy and implantation rate after transfer of cryopreserved bovine embryos.

L-carnitine is well known for its role in beta-oxidation, ATP production, and decreasing the lipid content during embryo development, with end results of improved cryo-survivability (Truong *et al.*, 2016). In buffaloes, the addition of L-carnitine to the medium significantly benefits embryonic developmental competence after vitrification, as evidenced by the high cleavage rate and the formation of morulae and blastocysts. Improving the cryotolerance of buffalo embryos directly after thawing may be through increased lipid metabolism (El-Sokary *et al.*, 2021). Furthermore, L-carnitine acts as an antioxidant blocking degenerative changes arising from oxidative stress during embryonic development (Bhakty *et al.*, 2021). Lowe *et al.* (2017) showed that the antioxidant capacity of L-carnitine was associated with the increased cleavage rate and the improved cryotolerance of resultant porcine blastocysts. Supplementation of L-carnitine to bovine embryo culture medium has been shown to scavenge ROS within two-cell stage embryos, antagonize the cryodamage, and enhance the cryotolerance of blastocysts (Takahashi *et al.*, 2013). It is plausible to suggest that L-carnitine may be used to improve the freezing survival of oocytes or embryos (Li *et al.*, 2021). Table 1 shows some effects of L-carnitine during *in vitro* culture of follicles, oocytes and embryos in different species.

Table 1 - Effects of L-carnitine during in vitro culture of follicles, oocytes and embryos in different species.

Effects	Species	Reference
Ovarian follicles		
Inhibits apoptosis, alleviates oxidative damage, and increases the survival and function of follicles cryopreserved <i>in situ</i> .	Murine	Zhang <i>et al.</i> , 2015.
Oocytes		
Exposure of oocyte to L-carnitine prior to insemination increase cleavage and improve cryotolerance of the resulting blastocysts.	Porcine	Lowe <i>et al.</i> , 2017.
Increases the percentage of oocytes reaching metaphase II.	Ovine	Bhakty <i>et al.</i> , 2021.
Increases the proportion of mature oocytes with uniform mitochondrial distribution in during <i>in vitro</i> maturation.	Murine	Zare <i>et al.</i> , 2015; Somfai <i>et al.</i> , 2011.
L-carnitine during <i>in vitro</i> maturation and subsequent oocyte vitrification improves the <i>in vitro</i> production rate of embryos.	Porcine	Chankitisakul <i>et al.</i> , 2013.
Increases the rate of nuclear maturation up to metaphase II (MII) stage, decreases the rate of degeneration and promotes the antrum formation.	Bovine	Modak <i>et al.</i> 2022
Increases oocyte competence during <i>in vitro</i> maturation and in the absence of FBS.	Buffalo	Marin <i>et al.</i> , 2020.
Embryos		
Increases lipid metabolism, improves development and cryo- tolerance.	Bovine	Takahashi <i>et al.</i> , 2013.
Improves post-thawing cryotolerance in cryopreserved embryos.	Bovine	Zolini <i>et al.</i> , 2019.
In combination with N-acetylcysteine and α -lipoic acid, it increases the number of cells in blastocyst.	Murine	Truong <i>et al.</i> , 2016.
Increases the cleavage rate, as well as the formation of morulae and blastocysts.	Buffalo	El-Sokary <i>et al.</i> , 2021.

Fonte: autores (2023)

Final considerations

Many factors inherent to the oocyte and the *in vitro* culture environment determine the chance of having a complete follicular development with success in the acquisition of oocyte competence *in vitro* and embryo production. Oxidative stress has been reported as one of the main factors associated with the poor quality of ovarian follicles, which certainly impacts follicular growth and oocyte competence. A culture system, with different combinations of hormones, growth factors and mainly antioxidant factors, at each stage of growth, is necessary to allow the follicles to present the adequate size in a long-term culture period. This study reports the advances of L-carnitine in the regulation of oxidative stress and lipid β -oxidation for use in reproductive technologies, including *in vitro* culture of ovarian follicles, oocyte maturation, embryo production and cryopreservation, especially due to stimulation energy generation combined with its antioxidant property. More studies are needed to identify the effects of L-carnitine in preventing adverse consequences associated with oxidative stress in the successful production of embryos and offspring produced from oocytes cultured *in vitro*.

REFERENCES

- ABDELRAZIK, H. et al. L-carnitine decreases DNA damage and improves the in vitro blastocyst development rate in mouse embryos. **Fertility and sterility**, v. 91, n. 2, p. 589–596, 2009.
- AGARWAL, A.; DURAIRAJANAYAGAM, D.; DU PLESSIS, S. S. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 12, n. 1, p. 112, 2014.
- AGARWAL, A.; SENGUPTA, P.; DURAIRAJANAYAGAM, D. Role of L-carnitine in female infertility. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 16, n. 1, p. 5, 2018.
- ALIABADI, E. et al. Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. **Iranian journal of reproductive medicine**, v. 10, n. 2, p. 77–82, 2012.
- ALVES, C. S. et al. Evaluation of melatonin effects on the production of bovine embryos obtained by in vitro fertilization and somatic cell nuclear transfer. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 43, n. 4, p. 815–823, 2019.
- BARSKY, M. et al. Are perinatal outcomes affected by blastocyst vitrification and warming? **American journal of obstetrics and gynecology**, v. 215, n. 5, p. 603.e1-603.e5, 2016.
- BEYER, D. A.; GRIESINGER, G. Vitified-warmed embryo transfer is associated with mean higher singleton birth weight compared to fresh embryo transfer. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 203, p. 104–107, 2016.
- BHAKTY, Z. W. et al. L-carnitine supplementation enhances nuclear and cytoplasmic maturation rates of sheep oocytes in vitro. **Tropical Animal Science Journal**, v. 44, n. 2, p. 131–137, 2021.
- CARRILLO-GONZÁLEZ, D. F.; HERNÁNDEZ-HERRERA, D. Y.; MALDONADO-ESTRADA, J. G. The role of L-carnitine in bovine embryo metabolism. A review of the effect of supplementation with a metabolic modulator on in vitro embryo production. **Animal biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 413–423, 2023.
- CASTILLO-MARTÍN, M. et al. Comparative effects of adding β -mercaptoethanol or L-ascorbic acid to culture or vitrification-warming media on IVF porcine embryos. **Reproduction, fertility, and development**, v. 26, n. 6, p. 875–882, 2014.
- CHANKITISAKUL, V. et al. Supplementation of maturation medium with L-carnitine improves cryo-tolerance of bovine in vitro matured oocytes. **Theriogenology**, v. 79, n. 4, p. 590–598, 2013.
- CHENG H.-J.; CHEN T. Clinical efficacy of combined L-carnitine and acetyl-L-carnitine on idiopathic asthenospermia. **Zhonghua nan ke xue [National journal of andrology]**, v. 14, n. 2, p. 149–151, 2008.

CORDEIRO, E. B. et al. Effects of N-acetylcysteine on growth, viability and reactive oxygen species levels in small antral follicles cultured in vitro. **Asian pacific journal of reproduction**, v. 12, n. 1, p. 42–48, 2023.

COSTA, F. DAS C. et al. Aloe vera increases collagen fibres in extracellular matrix and mRNA expression of peroxiredoxin-6 in bovine ovarian cortical tissues cultured in vitro. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 30, n. 3, p. 365–372, 2022.

CROCOMO, L. F. et al. In vitro embryo production: oxidative stress and antioxidants. **Veterinária e Zootecnia**, v. 19, n. 4, p. 470–479, 2012.

DALCIN, L. et al. Cytoskeleton structure, pattern of mitochondrial activity and ultrastructure of frozen or vitrified sheep embryos. **Cryobiology**, v. 67, n. 2, p. 137–145, 2013.

DEL COLLADO, M. et al. In vitro maturation impacts cumulus-oocyte complex metabolism and stress in cattle. **Reproduction**, v. 154, n. 6, p. 881–893, 2017.

DUBEIBE MARIN, D. F. et al. Influence of l-carnitine on lipid metabolism of buffalo cumulus-oocyte complexes matured in either fetal bovine serum or fatty acid-free bovine serum albumin. **Theriogenology**, v. 158, p. 382–390, 2020.

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

EL-SOKARY, M. M. M. et al. Impact of L-carnitine supplementation on the in vitro developmental competence and cryotolerance of buffalo embryos. **Veterinary world**, v. 14, n. 12, p. 3164–3169, 2021.

FENKCI, S. M. et al. Serum total L-carnitine levels in non-obese women with polycystic ovary syndrome. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 23, n. 7, p. 1602–1606, 2008.

FERREIRA, J. G. S. et al. Envelhecimento e a influência degenerativa dos radicais livres nesse processo. **Campina Grande**, 2020.

GENAZZANI, A. D. et al. Acetyl-L-carnitine (ALC) administration positively affects reproductive axis in hypogonadotropic women with functional hypothalamic amenorrhea. **Journal of endocrinological investigation**, v. 34, n. 4, p. 287–291, 2011.

GUALTIERI, R. et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress caused by cryopreservation in reproductive cells. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 3, p. 337, 2021.

HASHIMOTO, S. L-Carnitine decreased the apoptosis of granulosa cells and improved the meiotic competence of porcine growing oocytes. **Reprod Domest Anim**, v. 43, p. 190–191, 2008.

INFANTE, J. P. et al. Straight-chain acyl-CoA oxidase knockout mouse accumulates extremely long chain fatty acids from alpha-linolenic acid: evidence for runaway carousel-type enzyme kinetics in peroxisomal beta-oxidation diseases. **Molecular genetics and metabolism**, v. 75, n. 2, p. 108–119, 2002.

ISMAIL, A. M. et al. Adding L-carnitine to clomiphene resistant PCOS women improves the quality of ovulation and the pregnancy rate. A randomized clinical trial. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v. 180, p. 148–152, 2014.

IWATA, H. Resveratrol enhanced mitochondrial recovery from cryopreservation-induced damages in oocytes and embryos. **Reproductive medicine and biology**, v. 20, n. 4, p. 419–426, 2021.

KRSMANOVIĆ, L. Z. et al. Actions of acetyl-L-carnitine on the hypothalamo-pituitary-gonadal system in female rats. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 43, n. 4, p. 351–358, 1992.

KRSMANOVIC, L. Z. et al. Stimulation of gonadotropin-releasing hormone secretion by acetyl-L-carnitine in hypothalamic neurons and GT1 neuronal cells. **Neuroscience letters**, v. 165, n. 1–2, p. 33–36, 1994.

LI, J. et al. Biological roles of l-carnitine in oocyte and early embryo development. **Molecular reproduction and development**, v. 88, n. 10, p. 673–685, 2021.

LIU, J. et al. Comparison of the effects of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on carnitine levels, ambulatory activity, and oxidative stress biomarkers in the brain of old rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1033, n. 1, p. 117–131, 2004.

LOWE, J. L. et al. Cryotolerance of porcine blastocysts is improved by treating in vitro matured oocytes with L-carnitine prior to fertilization. **The Journal of reproduction and development**, v. 63, n. 3, p. 263–270, 2017.

MARTELLI, F.; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciencia e cultura**, v. 66, n. 3, p. 54–57, 2014.

MINGORANCE, C. et al. Pharmacological effects and clinical applications of propionyl-L-carnitine: Nutrition Reviews® Vol. 69(5):279-290. **Nutrition reviews**, v. 69, n. 5, p. 279–290, 2011.

MODAK, A. K. et al. L-carnitine supports the in vitro growth of buffalo oocytes. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 12, n. 15, p. 1957, 2022.

MOHD SHUKRI, M. F. et al. Effects of L-carnitine supplementation for women with polycystic ovary syndrome: a systematic review and meta-analysis. **PeerJ**, v. 10, p. e13992, 2022.

MONZO, C. et al. Slow freezing and vitrification differentially modify the gene expression profile of human metaphase II oocytes. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 27, n. 7, p. 2160–2168, 2012.

NASCIMENTO, D. R. et al. Effects of N-acetylcysteine on growth, viability, and ultrastructure of in vitro cultured bovine secondary follicles. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 12, n. 22, p. 3190, 2022.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

PAN, B. et al. Melatonin improves parthenogenetic development of Vitrified–Warmed mouse oocytes potentially by promoting G1/S cell cycle progression. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 12, p. 4029, 2018.

PAULINO, L. R. F. M. et al. Immunolocalization of melatonin receptors in bovine ovarian follicles and in vitro effects of melatonin on growth, viability and gene expression in secondary follicles. **Domestic animal endocrinology**, v. 81, n. 106750, p. 106750, 2022.

PREVEDELLO, M. T.; COMACHIO, G. Antioxidantes e sua relação com os radicais livres, e Doenças Crônicas Não Transmissíveis: uma revisão de literatura / Antioxidants and their relationship with free radicals, and Chronic Non communicable Diseases: a literature review. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 6, p. 55244–55285, 2021.

SÁ, N. A. R. et al. Anethole reduces oxidative stress and improves in vitro survival and activation of primordial follicles. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 8, 2018.

SADEESH, E. M. et al. Effect of growth factor and antioxidant on in vitro maturation of oocytes and cleavage rates of in vitro produced Indian buffalo (*Bubalus bubalis*) embryos. **Veterinarski arhiv**, v. 84, p. 459–474, 2014.

SAEED-ZIDANE, M. et al. Cellular and exosome mediated molecular defense mechanism in bovine granulosa cells exposed to oxidative stress. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0187569, 2017.

SAHRAEI, S. S., Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran; SHAHHOSEINI, M., Department of Genetics at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran; MOVAGHAR, B., Department of Embryology at Reproductive Biomedicine Research Center, Royan Institute for Reproductive Biomedicine, ACECR, Tehran, Iran. b. movaghar@royaninstitute. org. Vitrification has an effect like culture on gene expression and histone modification in mouse embryos. **Cryo letters**, v. 39, n. 2, p. 102–112, 2018.

SEKHON, L. et al. Blastocyst vitrification, cryostorage and warming does not affect live birth rate, infant birth weight or timing of delivery. **Reproductive biomedicine online**, v. 37, n. 1, p. 33–42, 2018.

SOMFAI, T. et al. 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, n. 7, p. 912–920, 2011.

SOMOSKOI, B. et al. Different chromatin and energy/redox responses of mouse morulae and blastocysts to slow freezing and vitrification. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 13, n. 1, p. 22, 2015.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M.-T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. **Research in veterinary science**, v. 132, p. 342–350, 2020.

SOUZA, L. M. V. et al. Treinamento intervalado de alta intensidade e estresse oxidativo: uma breve apresentação. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, p. e741986478, 2020.

SPIJKERS, S. et al. Fresh and frozen-thawed embryo transfer compared to natural conception: Differences in perinatal outcome. **Gynecologic and obstetric investigation**, v. 82, n. 6, p. 538–546, 2017.

STOJKOVIC, M. et al. Mitochondrial distribution and adenosine triphosphate content of bovine oocytes before and after in vitro maturation: correlation with morphological criteria and developmental capacity after in vitro fertilization and culture. **Biology of reproduction**, v. 64, n. 3, p. 904–909, 2001.

TAKAHASHI, T. et al. Supplementation of culture medium with L-carnitine improves development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Reproduction, fertility, and development**, v. 25, n. 4, p. 589–599, 2013.

TRUONG, T.; HARVEY, A. J.; GARDNER, D. K. Antioxidant supplementation of mouse embryo culture or vitrification media support more in-vivo-like gene expression post-transfer. **Reproductive biomedicine online**, v. 44, n. 3, p. 393–410, 2022.

TRUONG, T. T.; SOH, Y. M.; GARDNER, D. K. Antioxidants improve mouse preimplantation embryo development and viability. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 31, n. 7, p. 1445–1454, 2016.

VANELLA, A. et al. L -propionyl-carnitine as superoxide scavenger, antioxidant, and DNA cleavage protector. **Cell biology and toxicology**, v. 16, n. 2, p. 99–104, 2000.

VINING, L. M. et al. The role of apoptosis in cryopreserved animal oocytes and embryos. **Theriogenology**, v. 173, p. 93–101, 2021.

VOLPE, C. M. O. et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. **Cell death & disease**, v. 9, n. 2, p. 119, 2018.

WOLPE SIMAS, L. A.; GRANZOTI, R. O.; PORSCH, L. Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 2, 2019.

WU, Z. et al. Melatonin improves in vitro development of vitrified-warmed mouse germinal vesicle oocytes potentially via modulation of spindle assembly checkpoint-related genes. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 9, p. 1009, 2019.

ZARE, Z. et al. Effect of L-carnitine supplementation on maturation and early embryo development of immature mouse oocytes selected by brilliant cresyle blue staining. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 32, n. 4, p. 635–643, 2015.

ZARE, Z.; REZAEI, N.; MOHAMMADI, M. Treatment of mouse cumulus-oocyte complexes with L-carnitine during vitrification and in vitro maturation affects maturation and embryonic developmental rate after parthenogenetic activation. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 51, n. 1, p. 44–50, 2022.

ZHANG, Q. et al. Effects of L-carnitine on follicular survival and graft function following autotransplantation of cryopreserved-thawed ovarian tissues. **Cryobiology**, v. 71, n. 1, p. 135–140, 2015.

ZHANG, S. et al. Hypothermic machine perfusion after static cold storage improves ovarian function in rat ovarian tissue transplantation. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 37, n. 7, p. 1745–1753, 2020.

ZOLINI, A. M. et al. Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 133, p. 135–143, 2019.

3 JUSTIFICATIVA

No Brasil a espécie bovina é de grande importância comercial na agropecuária, pois a partir dela são destinados produtos para diversas partes do mundo, como grandes quantidades de carne, leite e derivados (Mueller e Van Eenannaam, 2022; Ferst *et al.*, 2020). Em consequência disso, é incessante a busca pelo melhoramento genético desses animais. Dessa forma, a utilização de técnicas que aumentem o potencial reprodutivo de animais de alto valor genético é de extrema importância. Com esse propósito, biotécnicas de reprodução animal são constantemente aprimoradas (Vilela *et al.*, 2021). Nesse sentido, se faz necessário aprofundar os estudos sobre os mecanismos fisiológicos como a foliculogênese ovariana por meio de biotécnicas de cultivo *in vitro* (Silva *et al.*, 2022).

Entretanto, a produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROS), é observada durante o cultivo *in vitro*, o que compromete o desenvolvimento folicular ovariano, causando estresse oxidativo (EO) nas células, tornando-se um fator limitante para o cultivo, sendo assim é de suma importância mais estudos que colaborem para atenuar este problema (Soto-Heras, Paramio, 2020). Para minimizar problemas relacionados ao acúmulo de EROS no cultivo *in vitro* alguns estudos demonstram que o uso de substâncias antioxidantes podem ser uma estratégia eficiente (Rakha *et al.* 2022; Yan *et al.*, 2022; Paulino *et al.*, 2018; Cunha *et al.*, 2018). Assim, a busca de substâncias que possam melhorar a utilização dos meios de cultivos apresenta relevância para o sucesso da técnica.

A acetil-L-carnitina já demonstrou contribuir para a eliminação de radicais livres, especialmente ânions superóxido, protegendo as células de apoptose induzida por dano oxidativo (Qian *et al.*, 2021; Shafiei *et al.*, 2020). Quando utilizada para compor meio de cultivo *in vitro*, em MIV, apresentou melhora no aumento e expansão da célula do cumulus bem como na atividade mitocondrial e demonstrou melhorar a sobrevivência de embriões oriundos de PIV após criopreservação, o que pode ser associado a melhora da qualidade de embrião (Bhakty *et al.*, 2021; Chankitisakul *et al.*, 2013). A acetil-L-carnitina se destaca por contribuir para a eliminação de radicais livres, especialmente ânions superóxido, protegendo as células de apoptose induzida por dano oxidativo (Qian *et al.*, 2021; Shafiei *et al.*, 2020). O desenvolvimento *in vitro* de folículos, especialmente em estágios iniciais, é uma técnica promissora para a preservação da fertilidade e o tratamento da infertilidade. Nesse contexto, o uso de antioxidantes como a acetil-L-carnitina pode ser crucial para proteger as células reprodutivas contra o estresse oxidativo, promovendo um ambiente mais favorável para o crescimento e a maturação dos folículos.

4 HIPÓTESES

- A adição de acetil-L-carnitina ao meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino promove ativação folicular.
- A adição de acetil-L-carnitina ao meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano promove o desenvolvimento um folicular satisfatório na espécie bovina.
- A adição de acetil-L-carnitina ao meio de cultivo *in vitro* de tecido ovariano mantém a morfologia das células estromais de bovinos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Analisar o potencial antioxidante da acetil-L-carnitina e avaliar os efeitos da suplementação de diferentes concentrações de acetil-L-carnitina durante o cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de acetil-L-carnitina (10, 50 ou 100 μM) sobre a ativação e desenvolvimento folicular, morfologia, densidade celular do estroma e integridade da matriz extracelular após 6 dias de cultivo *in vitro* de tecido ovariano bovino.
- Quantificar os níveis de mRNA para SOD, CAT, GPX1, PRDX6 e NRF2 em tecido ovariano bovino após 6 dias de CIV na presença de diferentes concentrações de acetil-L-carnitina (10, 50 ou 100 μM).

CAPÍTULO II

Effects of acetyl-L-carnitine during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue

Effects of acetyl-L-carnitine during *in vitro* culture of bovine ovarian tissue

Allana M. F. Leitão¹, Antonia V. N. Azevedo¹, Bianca R. Silva¹, Efigênia C. Barbalho¹;
Ernando I. T. Assis¹; Francisco C. Costa¹; Fabrício S. Martins¹; José R.V. Silva^{1*}

¹Laboratory of Biotechnology and Physiology of Reproduction (LABIREP), Federal University of Ceara,
Sobral, CE, Brazil

* **Correspondence:** Corresponding Author jrvsilva@ufc.br

Abstract

This study aimed to analyze the effects of acetyl-L-carnitine for the first time on bovine ovarian tissue cultured *in vitro*, investigating its effects on follicular morphology, stromal cell density and extracellular matrix (ECM), as well as the expression of mRNA for SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2. Ovarian tissue fragments were cultured for 6 days in α -MEM alone or supplemented with 10, 50 or 100 μ M acetyl-L-carnitine, with 60% of the medium being changed every two days of culture. Before (non-cultured control) and after cultivation, the fragments were fixed in paraformaldehyde (4%) for 12 hours for histological analysis, or stored at -80°C for analysis of mRNA expression for SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2. The results showed that supplementing the culture medium with 100 μ M acetyl-L-carnitine increased the density of stromal cells in cultured ovarian tissues, as well as maintaining the highest rate of morphologically normal follicles. However, the presence of acetyl-L-carnitine in the culture medium did not influence the percentage of collagen in ovarian tissue and the expression of SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2. In conclusion, the presence of 100 μ M acetyl-L-carnitine in the ovarian tissue culture medium favors stromal cell density and morphologically normal follicle rates.

Keywords: acetyl-L-carnitine, antioxidant, *in vitro* culture, ovarian follicles, oxidative stress.

Introduction

Pre-antral ovarian follicles can be cultured *in vitro* in order to maximize and use oocytes to be used in assisted reproductive technologies (ART) (Silva and Silva, 2023). In this sense, the *in vitro* cultivation of follicles included in ovarian tissue seeks to deepen studies mainly of initial follicular development (Silva *et al* 2022; Figueiredo *et al.*, 2011; Telfer *et al.*,

2000). Furthermore, *In vitro* culture of ovarian tissue can be used as a tool to evaluate factors secreted by cells during the growth and maturation of follicles and oocytes (Rajabi *et al* 2018). Ovarian stromal cells are the main part of the ovarian tissue cell population, accounting for around 80% of these cells (Asadi *et al.*, 2022; Wagner *et al.*, 2020; Shahri *et al.*, 2019). which also include granulosa cells and theca cells (Pei *et al.*, 2023), together they play a regulatory role in the development of follicles (Najafi *et al.*, 2023; Telfer and Zelinski 2013). The density of the stromal cells is another important aspect, as it indicates the integrity of the tissue and its mechanical sensitivity (Grosbois *et al.*, 2023). Similarly, the ovarian extracellular matrix is associated with the surface of ovarian cells, forming a network of macromolecules that contain follicles and stromal cells, as well as other constituents such as fibrous proteins, water, and proteoglycans (Grosbois *et al.*, 2023; Theocharis *et al.*, 2016).

In vitro culture, there can be a high production of reactive oxygen species (ROS) that cause oxidative stress (OS) (Silva *et al.*, 2022). OS can lead to lower embryo quality, decreased pregnancy rates due to follicular apoptosis and abnormal morphology of follicles and ovarian stromal cells (Najafi *et al* 2023). Antioxidants have been used to mitigate the effects of EO during *in vitro* systems, so one of the antioxidants being tested is acetyl-L-carnitine. Acetyl-L- carnitine is a short-chain ester derived from L-carnitine, it is one of the most abundant, and has been shown to be more bioavailable than L-carnitine when used endogenously (Placidi *et al.*, 2022). It acts in the biosynthesis of lipids in mitochondria, and can protect against oxidative stress (Wang *et al.*, 2020). Its acetyl and carnitine components give this compound a greater chance of maintaining acetyl-coenzyme A levels (Albogami, 2023; Adeva- Andany *et al.*, 2017) during the transportation of fatty acids to the mitochondria for energy production through β -oxidation (Tauqir *et al.*, 2021). Studies claim that acetyl-L-carnitine has been shown to have antioxidant activities, such as the reduction of damage to oocytes related to oxidative stress products, absorption of ROS in tissues, reduction of cell proliferation and inflammation in cancer cells (Li *et al.*, 2023; Albogami *et al.*, 2023; Qian *et al.*, 2021; Dunning *et al.*, 2014). Thus, the aim is to test acetyl-L-carnitine for the first time in bovine ovarian tissue cultured *in vitro*.

1 Material and Methods

1.1 Chemical products

The culture media and other chemicals used in this study were purchased from Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA), unless otherwise indicated in the text. This study

was approved and carried out in accordance with the rules and guidelines of the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Ceará (Nº 03/2022).

1.2 Ovarian collection

Ovaries from 8 cows were collected at a local slaughterhouse (Sobral, Ceará, Brazil) after official permission from the administration to use the ovaries for research purposes. Immediately after death, the ovaries were washed with 70% ethanol for approximately 10 s, followed by two washes in TCM-199 supplemented with penicillin (100 µg/ml) and streptomycin (100 µg/ml) and buffered with HEPES. Ovaries were transported in 1 h to the laboratory in TCM-199 at 4 °C (PAULINO *et al.*, 2018).

1.3 *In vitro* culture of ovarian tissue

In the laboratory, ovarian cortex from each pair of ovaries was divided into 18 fragments of approximately 3x3x1 mm in dissection medium composed of α -MEM supplemented with penicillin (100 µg/mL) and streptomycin (100 µg/mL) and cultured for 6 days in 24-well plates (2 fragments per well) containing 500 µL of culture medium. In the culture medium was α -MEM (pH 7.2 - 7.4) supplemented with 50 µg/mL ascorbic acid, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine, penicillin 100 µg/mL, streptomycin 100 µg/mL, 1.25 mg/mL bovine serum albumin (BSA), 10 µg/mL insulin, 5.5 µg/mL transferrin, and 10 µg/mL selenium (ITS). This control medium was referred to as α -MEM+. The fragments were cultured in α -MEM+ alone or supplemented with 10, 50 or 100 µM of acetyl-L-carnitine (Altun *et al.*, 2013; Ishii *et al.*, 2000). The culture conditions were 38.5°C and 5% CO₂ in humidified air. The culture medium was stabilized at 38.5°C for 4 hours before use and partially changed (60%) every two days (Costa *et al.*, 2021). Before (uncultured control) or after *in vitro* culture, the ovarian tissues were fixed in paraformaldehyde (4%) for 12 hours for histological analysis, or stored at -80°C for analysis of mRNA expression for SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2. This experiment was repeated 8 times.

1.4 Morphological analyses of ovarian follicles

Histological analysis was performed according to the methodology of Bizarro-Silva *et al.* (2018), with modifications. The ovarian fragments were fixed in paraformaldehyde (4%) for 12 h and destined for classical histology. Then, the fragments were dehydrated in increasing

concentrations of ethanol, clarified with xylene, and embedded in histological paraffin. The fragments were embedded in paraffin sectioned serially at a thickness of 7 μm . Every fifth section was mounted on slides and stained with hematoxylin-eosin. Only the follicles in which the oocytes had evident nucleus were analyzed to avoid double counting. The slides were identified by anonymous codes to avoid subjective analysis and were examined under a microscope (Nikon, TS 100, Japan) at 100x and 400x magnification. The evaluation of follicular activation and growth the follicles were classified as primordial (central oocyte surrounded by a layer of sidewalk granulosa cells) or growing follicles (primary: central oocyte surrounded by a layer of cuboidal granulosa cells, and secondary: central oocyte with two or more layers of cuboidal granulosa cells) (Figueiredo; Lima, 2017). These follicles were then classified as normal when they had an intact oocyte, granulosa cells organized in one or more layers and no pyknotic nucleus, and degenerated when they had a retracted oocyte, pyknotic nucleus and/or surrounded by disorganized granulosa cells detached from the basement membrane (Telfer *et al.*, 2008). The percentages of healthy primordial and developing follicles were calculated before and after culture.

1.5 Ovarian stromal cell density

Evaluation of ovarian stromal cell density was performed in uncultured tissues and in tissues cultured for 6 days in the different treatments. The number of stromal cells in an area of 100 μm^2 was calculated in five fields from different histological sections from five different animals. The average number of stromal cells per field was calculated, in each treatment, as described previously Cavalcante *et al.* (2019). All evaluations and measurements were performed by a single operator.

1.6 Analysis of extracellular matrix (ECM)

To evaluate the collagen fibers in the extracellular matrix (ECM), the sections were stained with Picrosirius Red (Abcam Kit), following the methodology described by Rittié (2017) with modifications. Briefly, the sections were deparaffinized in xylene and incubated in Sirius Red (0.1%) solution for 1 hour at room temperature. The excess dye was then removed with acetic acid solution (0.5%) and the sections were evaluated under an optical microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) at 400x magnification. For each treatment, the percentage of the area occupied by collagen fibers in five different fields was measured using a DS Cooled

Camera Head DS-Ri1 attached to a microscope (Nikon, Eclipse, TS 100, Japan) and the images were analyzed using Image J software (version 1.451p, 2017) at 400x magnification. Only the collagen fibers were stained red with Picrosirius stain, while the follicles remained colorless (white). The analyzer software automatically excluded the circumference of the uncolored follicles from the total area marked in red.

1.7 Expression of mRNA for SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2 in ovarian tissue

For gene expression analysis, ovarian tissues were stored at -80°C immediately after the end of the culture period until extraction of total RNA for further analysis of the expression of SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2 mRNAs. Tissues cultured in control medium (α -MEM+) alone or supplemented with 100 μ M of acetyl-L-carnitine were selected to investigate mRNA expression. For this, ovarian tissues were macerated and then subjected to total RNA extraction using a TRIzol® purification kit (Invitrogen, São Paulo, Brazil) according to the manufacturer's instructions. Quantification of mRNA was performed using SYBR Green. PCR reactions were composed of 1 μ L cDNA as template in 7.5 μ L of SYBR Green Master Mix (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5.5 μ L of ultrapure water, and 0.5 μ M of each primer. The primers were designed to perform amplification of GAPGH, SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2 (Table 1). The thermal cycling profile for the first PCR cycle was initial denaturation and activation of the polymerase for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 30 s at 58°C, and 30 s at 72°C. The final extension was 10 minutes at 72°C. All reactions were performed on a Step One Plus instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, SA). The $\Delta\Delta$ Ct method (Livak e Schmittgen, 2001) was used to transform the Ct values into normalized relative expression levels.

Table 1 – Primer sequence

Gene alvo	Sequência de primers (5' - 3')	Senso (S), anti-senso (As)	Acesso ao número do Genbank
GAPDH	TGTTTGTGATGGGCGTGAACCA ATGGCGCGTGGACAGTGGTCATAA	S AS	GI: 402744670
GPX1	AACGTAGCATCGCTCTGAGG GATGCCCAAACCTGGTTGCAG	S As	GI:156602645
SOD	GTGAACAACCTCAACGTCGC GGGTTCTCCACCACCGTTAG	S As	GI: 31341527
CAT	AAGTTCTGCATCGCCACTCA GGGGCCCTACTGTCAGACTA	S As	GI:402693375
PRDX6	GCACCTCCTCTTACTTCCCG GATGCGGCCGATGGTAGTAT	S AS	GI: 59858298
NRF2	GACCCAGTCCAACCTTTGTC GACCCGGACTTACAGGTACT	S AS	GI: 030494.1

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (9.0). The percentages of normal follicles, as well as of primordial and developing follicles were evaluated by the chi- square test. Data on collagen fiber distribution, stromal cell density and mRNA levels for SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2 were analyzed by Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's comparison. Results were expressed as mean and standard deviation (mean $\pm$ SD). Differences were considered significant when $p \geq 0.05$.

2 Results

2.1 Effect of acetyl-L-carnitine on follicular morphology after *in vitro* culture

In total, 615 follicles were analyzed. Figure 1 shows the morphology of normal and degenerated follicles in different categories in uncultured and *in vitro* cultured tissues. Morphologically normal follicles exhibited oocytes with central nucleus and intact and well-

organized granulosa cells, while degenerated follicles showed nuclear pyknosis, cytoplasmic retraction or disorganization of granulosa cells.

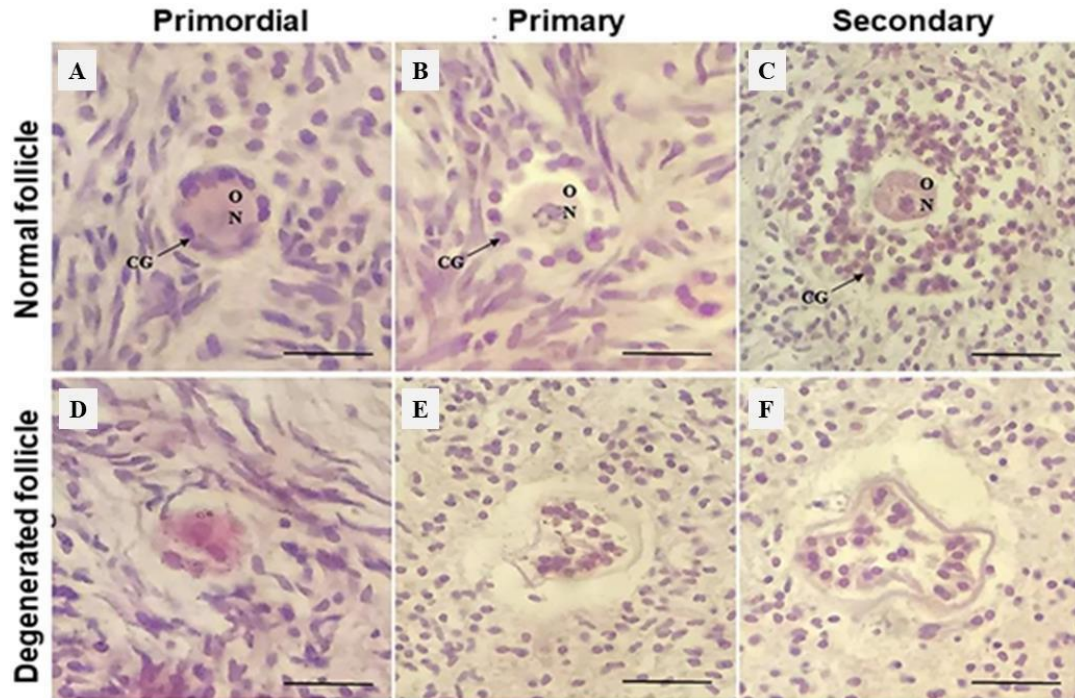


Figure 1 - Representative images of bovine ovarian tissue cultured *in vitro* for 6 days showing morphologically normal (A – C) and degenerated (D – F) follicles from different stages of development stained with hematoxylin and eosin. (A) Normal and (D) Degenerated primordial follicles; (B) normal and (E) degenerated primary follicles; (C) Normal secondary follicle and (F) degenerated. Granulosa cells (GC); Oocyte (O); Oocyte nucleus (N). (400 $\times$, Scale bar: 100 μ m).

After 6 days of culture, a significant decrease in the percentage of morphologically healthy follicles was observed in all treatments when compared to the non-cultured control (Figure 2).

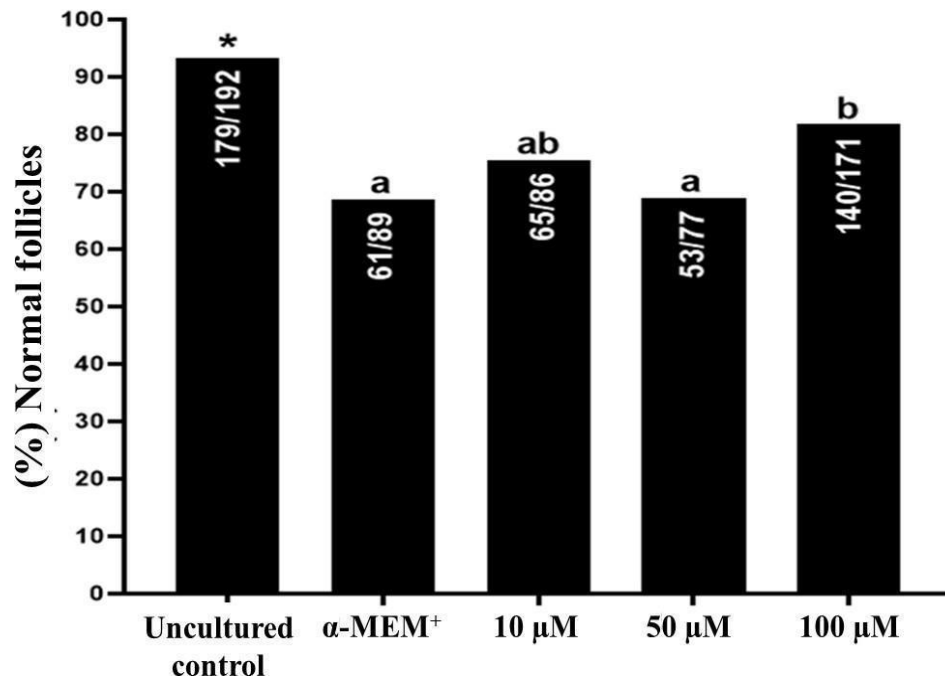


Figure 2 - Percentage of normal follicles in uncultured ovarian tissues or in tissues cultured in α -MEM⁺ alone or supplemented with 10, 50, or 100 μ M Acetyl-L-carnitine for 6 days. *Represents a significant difference compared to the non-cultured control. a,b Different letters represent statistically significant differences between treatments ($P < 0.05$).

Among the treatments, ovarian tissues cultured in presence of 100 μ M acetyl-L-carnitine showed higher percentages of normal follicles when compared to tissues cultured in control medium (α -MEM⁺) alone or supplemented with 50 μ M acetyl-L-carnitine. In addition, tissue cultured in the presence of 10 of 50 μ M of acetyl-L-carnitine showed similar percentages of normal follicles (Figure 2).

2.2 Effect of acetyl-L-carnitine on primordial follicle activation and development

Regardless of the treatment, ovarian tissues cultured *in vitro* had reduced percentages of primordial and increased rate of developing follicles when compared to uncultured tissues. However, the presence of acetyl-L-carnitine in the culture medium did not influence the percentages of primordial follicles activation and development after 6 days *in vitro* culture (Figure 3).

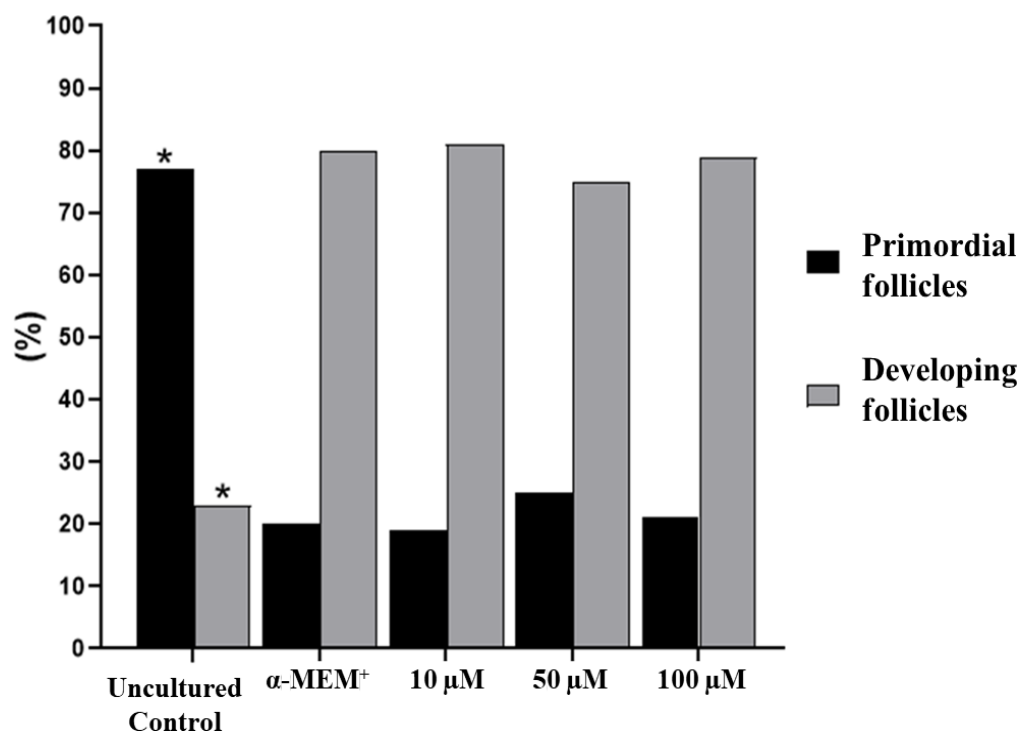


Figure 3 - Percentage of primordial and developing follicles in uncultured ovarian tissue cultured in α -MEM⁺ alone or supplemented with 10, 50, or 100 μ M Acetyl-L-carnitine for 6 days. *Represents a statistically significant difference between treatments ($P < 0.05$).

2.3 Effect of acetyl-L-carnitine on ovarian stromal cell density after *in vitro* culture

The number of stromal cells in ovarian tissues cultured for 6 days in α -MEM⁺ alone or supplemented with 10 μ M or 50 μ M did not differ from that seen in uncultured tissues. In contrast, the presence of 100 μ M acetyl-L-carnitine increased the number stromal cells in ovarian tissues when compared to uncultured tissues or tissues cultured in α -MEM⁺ alone or supplemented with 10 μ M acetyl-L-carnitine. The number of stromal cells in ovarian tissues cultured for 6 days in α -MEM⁺ supplemented with 50 μ M or 100 μ M was significantly different (Figure 4). Figure 5 shows representative images of the ovarian stroma in the different treatment groups.

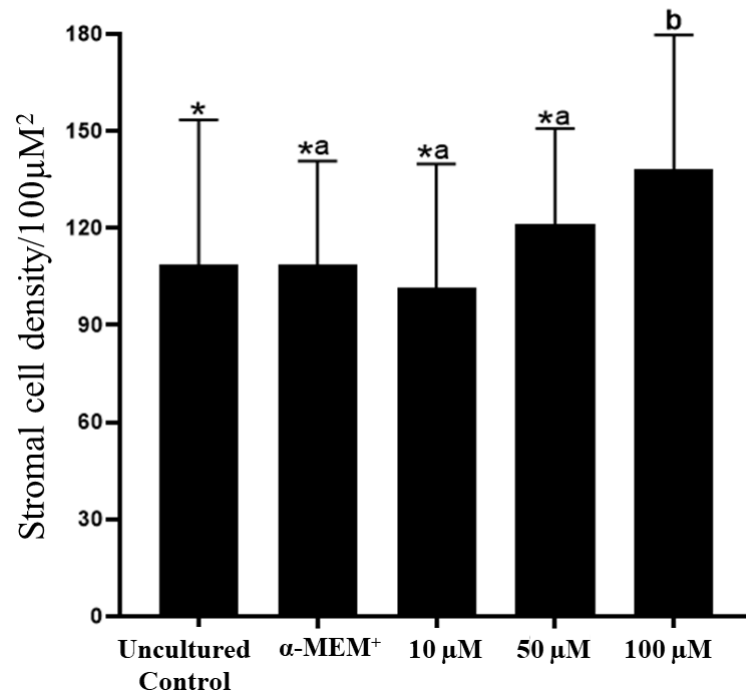


Figure 4 - Stromal cell density in uncultured ovarian tissues and in tissues cultured in α -MEM⁺ alone or with 10, 50, or 100 μ M Acetyl-L-carnitine for 6 days. Lowercase letters a and b represent statistically significant differences between treatments ($P < 0.05$).

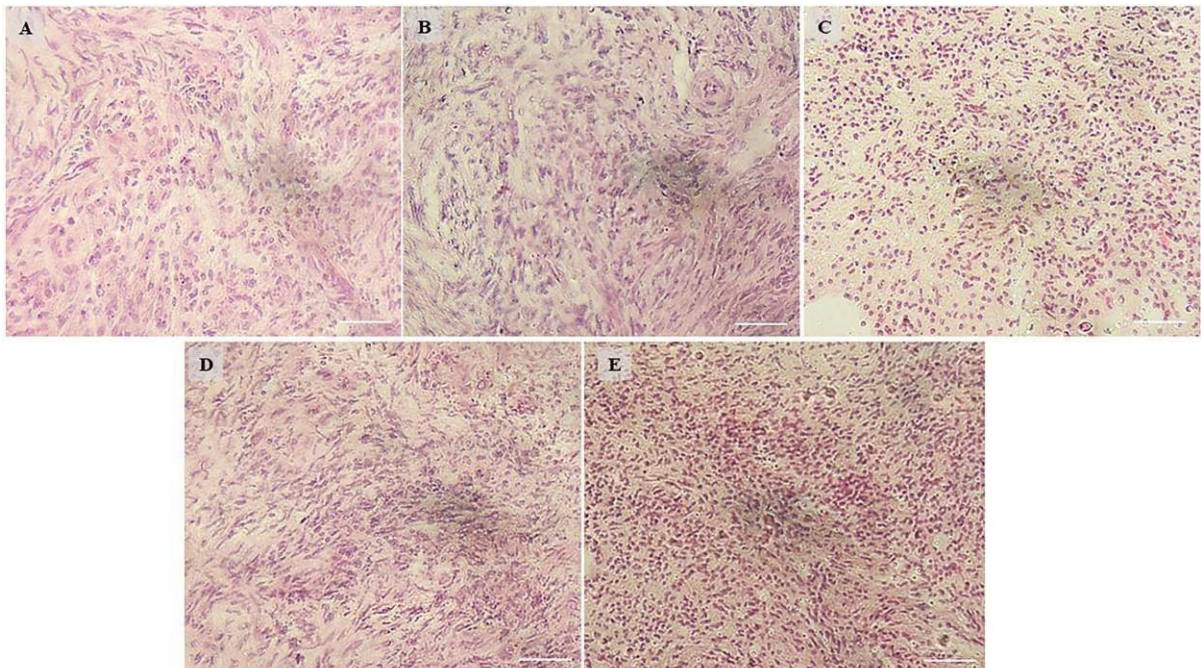


Figure 5 - Representative images of ovarian stromal cell density tissues and in tissues cultured in α -MEM⁺ alone or with 10, 50, or 100 μ M Acetyl-L-carnitine for 6 days. (A) Fresh control; (B) α -MEM⁺; (C) 10 μ M; (D) 50 μ M; (E) 100 μ M. (400 $\times$ Scale bar: 100 μ m).

2.4 Effect of acetyl-L-carnitine on extracellular matrix (ECM)

Cultured tissues had reduced percentage of area occupied by collagen fibers when compared to non-cultured tissues. The presence of acetyl-L-carnitine in the culture medium, however, did not influence the percentage of collagen in the ovarian tissue after 6 days of culture (Figure 6). Figure 7 shows representative images of collagen fibers after staining with picrosirius red in the non-cultured tissues and in tissue cultured in the different treatments.

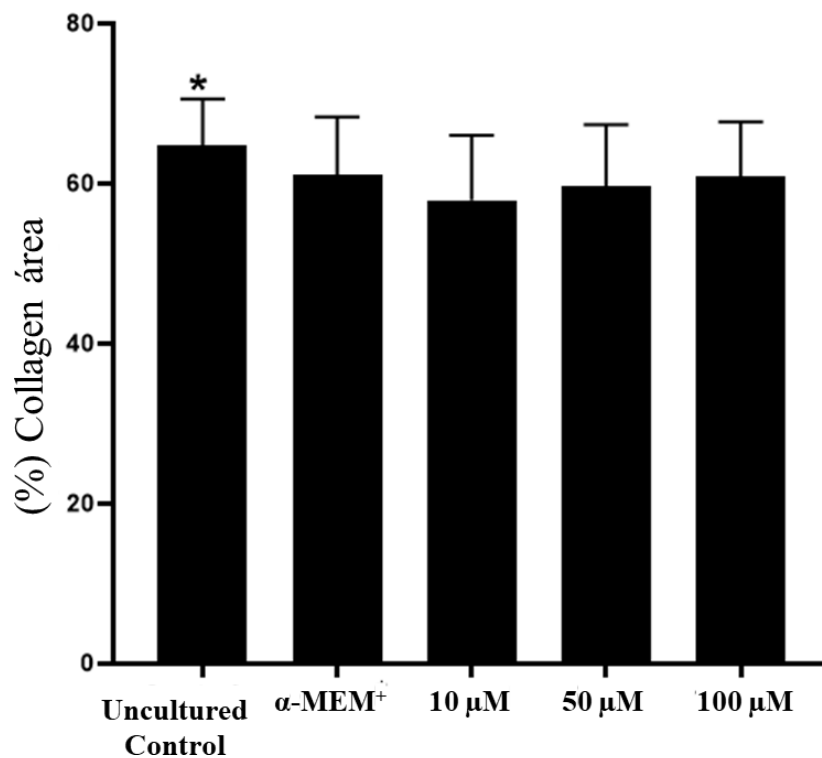


Figure 6 - Collagen fiber levels in uncultured and cultured ovarian tissue in α -MEM⁺ alone or with 10, 50 or 100 μ M Acetyl-L-carnitine for 6 days. *Represents a statistically significant difference compared to the non-cultured control ($P < 0.05$).

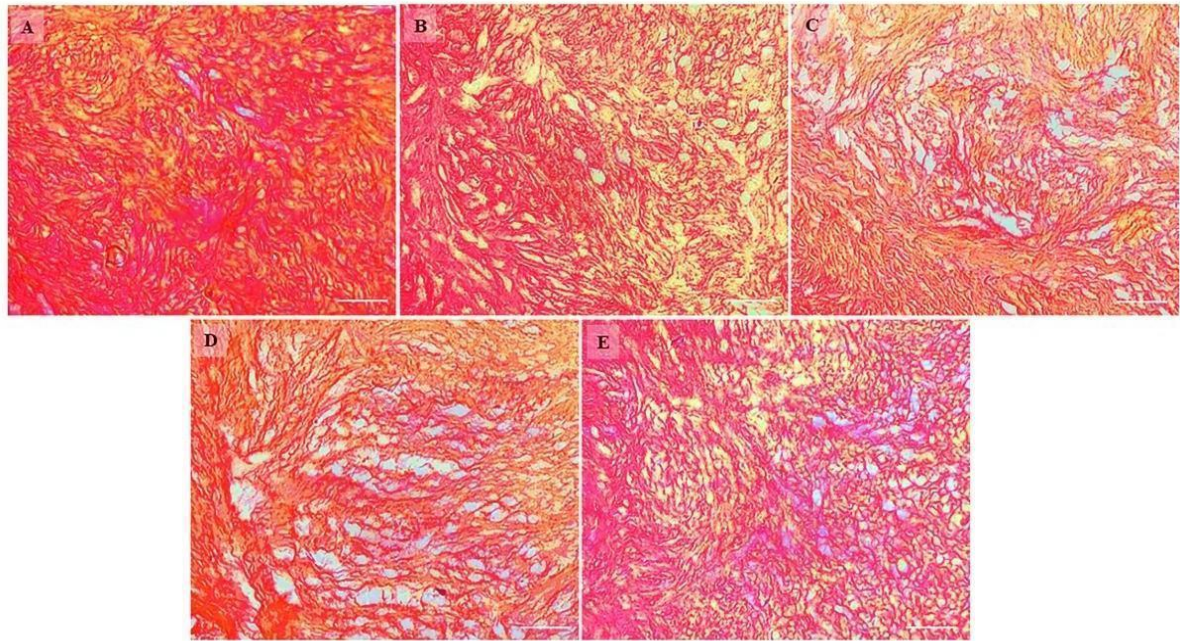


Figure 7 - Representative images of collagen fibers stained by Picrosirius red. (A) Fresh control; (B) α -MEM⁺; (C) 10 μ M; (D) 50 μ M; (E) 100 μ M.

2.5. Expression of mRNA for SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2 in ovarian tissue

Relative mRNA levels for CAT, SOD, GPX1, PRDX-6 and NRF2 are shown in Figure 8A-E. The presence of Acetyl-L-carnitine in culture medium did not influence the expression of these transcripts ($P > 0.05$).

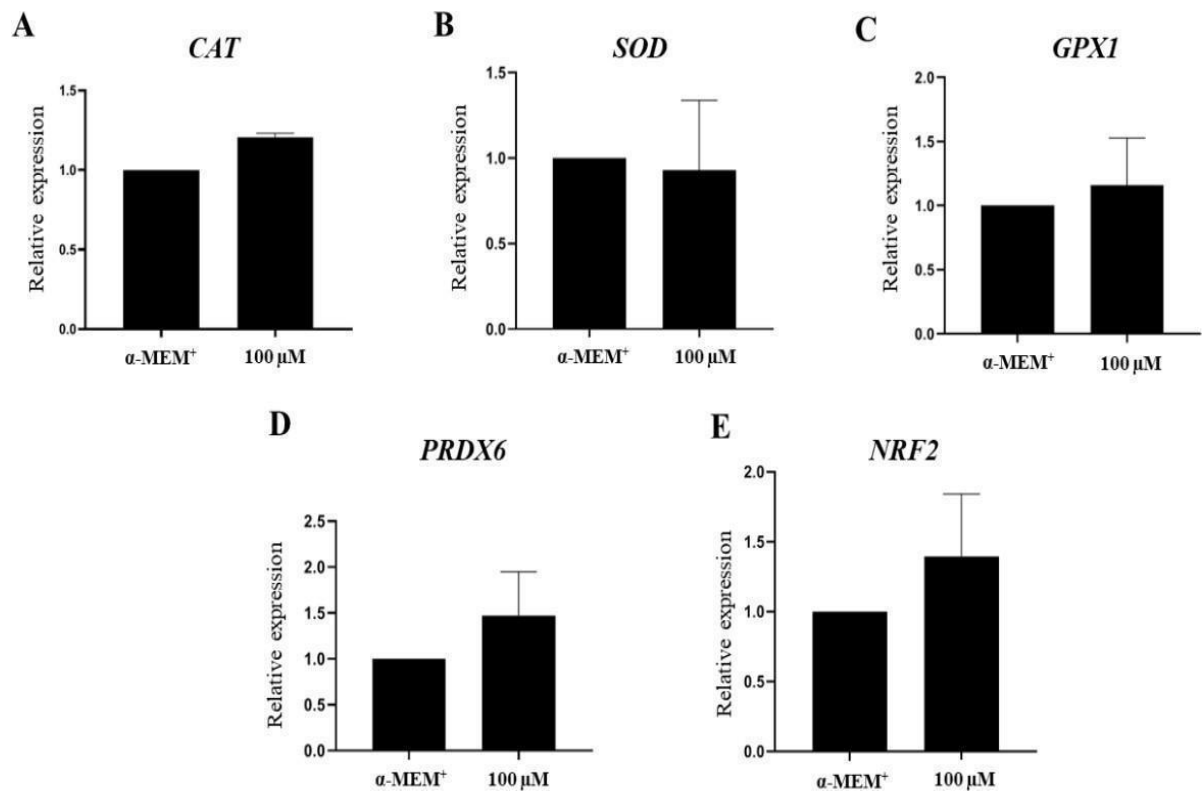


Figure 8 - Levels of mRNA for (A) CAT, (B) SOD, (C) GPX1, (D) PRDX6 and (E) NRF2 in ovarian tissue cultured in α -MEM⁺ alone or with 100 μ M Acetyl-L-carnitine for 6 days. * Represents statistically significant difference between treatments ($P < 0.05$).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first study to demonstrate the effect of acetyl-L-carnitine during the culture of bovine ovarian tissue. In our studies, a 100 μ M concentration of acetyl-L-carnitine enhanced the percentage of morphologically normal follicles and supported the maintenance of stromal density.

In fact, acetyl-L-carnitine plays an important role in regulation not only as an antioxidant but also by acting on crucial factors in maintaining bioenergetic homeostasis during *in vitro* cultivation (Qian *et al.*, 2021). In the present study, we found that supplementation of culture medium with 100 μ M acetyl-L-carnitine increased the percentage of morphologically normal follicles after 6 days of culture. It is known that follicles with a flat, scaly morphology pass from stage to stage until they begin to proliferate and become cuboidal (Jones and Shikanov, 2019). Li *et al.* (2023), in a study with human ovarian granulosa cells, showed that L-carnitine at a concentration similar to that used (80 μ M) had the potential to reduce apoptosis, and therefore exert a protective effect on ovarian follicles, as observed in our study. In a recent

study, it was observed that the addition of Acetyl-L-Carnitine to the culture medium maintains the viability of yak granulosa cells, as well as promoting proliferation by reducing ROS, increasing the expression of PCNA, BCL-2, CCNB1 and CCND1 and decreasing the expression of BAX, CASP3 and P53 (Jiang *et al.*, 2023). In addition, the mechanisms through which carnitines exert positive effects on the development of follicles, oocytes and embryos include beta-oxidation, antioxidant response and protection against apoptosis (Placidi *et al.*, 2022). Xu *et al.* (2018) reported that Acetyl-L-Carnitine improves mitochondrial function, regulates oocyte-derived paracrine factors, and increases steroid hormone production, thus improving the quality of mature oocytes and enhancing *in vitro* embryonic development in buffaloes. Thus, Acetyl-L-Carnitine plays an important role in regulating the metabolic activity of mitochondria and promoting antioxidant activity, crucial factors in maintaining bioenergetic homeostasis during *in vitro* culture. These functions may have played a fundamental role in the survival of bovine ovarian follicles.

In the current study, it was observed that a higher concentration of Acetyl-L-Carnitine (100 μ M) increased the density of stromal cells and the number after 6 days of culture. Ovarian stromal cells are known to be responsible for producing growth factors and peptides that are essential for follicular development (Kinnear *et al.*, 2020). According to Barbato *et al.* (2023), the conditions of the *in vitro* culture environment must maintain follicular health, as well as the health of the cells contained therein, and the relationship between follicles and ovarian stromal cells and their physiology. As well as growth factors and hormones that influence this follicular development (Barbato *et al.*, 2023).

Stromal cells are related to the theca cells and granulosa cells (Pei *et al.*, 2023), establishing a connection between the follicles and the surrounding cells and influencing follicular development (Dolmans *et al.*, 2020). Hartanti *et al.* (2019) suggest that stromal cells are mainly responsible for stromal expansion during ovarian development. Studies have reported the ability of stromal cells to increase granulosa cell proliferation and hormone production (Asadi *et al.* 2022; Qiu *et al.*, 2014). Therefore, our findings corroborate with previous data where a positive relationship was observed between follicular morphology and the density of stromal cells after ovarian tissue culture (Cavalcante *et al.*, 2019). Thus, ovarian stromal cell density may play an important role in both follicle growth and survival and affect the regulation of the initiation of follicular growth *in vitro* (Asadi *et al.* 2022; Najafi *et al.*, 2023; Telfer and Zelenski 2013). Our results suggest that the concentration (100 μ M) that maintained a high percentage of stromal cells was the same one capable of maintaining the highest percentage of morphologically healthy follicles, facts that may be closely related, may be due

to the fact that the tissues cultured with acetyl-L-carnitine (100 μ M) had greater follicular development than those cultured in control medium.

The intense follicular activation and accelerated growth that occur *in vitro* are one of the main challenges of the culture system and it has been observed that fragmentation of the ovarian tissue can further increase the activation process by interrupting the Hippo pathway (Devos *et al.*, 2020). We observed an increase in follicular development followed by activation of the follicles present in the ovarian tissue fragments, using a concentration of 100 μ M after a 6-day culture period.

The ECM present in the ovary promotes contact between the follicles and stromal cells, causing natural stiffening and loosening processes, and is also rich in substances such as collagen, glycoproteins, and elastin (Grosbois *et al.*, 2023; Tang, 2020). Although the concentrations did not show better results in terms of development, collagen fibers in the ECM in the ovarian tissue when compared to the uncultured sample (fresh control), showed no differences between the treated groups. A similar situation occurred in relation to mRNA expression for SOD, CAT, PRDX6, GPX1 and NRF2 in the ovarian tissue when compared to the uncultured sample (fresh control), no differences were observed between the groups. Enzymatic mechanisms promote the breakdown and removal of ROS, participate in processes such as the breakdown of glucose by cumulus cells generating pyruvate metabolized in the oocyte by different enzymes, and perform functions that are essential in the removal of naturally produced harmful oxygen (Von Mengden *et al.*, 2020; Steckiewicz *et al.*, 2019; Wang *et al* 2017; Nimse and Pal, 2015).

In conclusion, the presence of 100 μ M acetyl-L-carnitine in the ovarian tissue culture medium favors stromal cell density and morphologically normal follicle rates.

REFERENCES

- ADEVA-ANDANY, M. M. et al. Significance of l-carnitine for human health. **IUBMB life**, v. 69, n. 8, p. 578–594, 2017.
- ALBOGAMI, S. The potential inhibitory role of acetyl-L-carnitine on proliferation, migration, and gene expression in HepG2 and HT29 human adenocarcinoma cell lines. **Current issues in molecular biology**, v. 45, n. 3, p. 2393–2408, 2023.
- ALTUN, Z. et al. Protective effect of acetyl-l-carnitine against cisplatin ototoxicity: role of apoptosis-related genes and pro-inflammatory cytokines. **Cell proliferation**, v. 47, n. 1, p. 72–80, 2014.
- ASADI, E.; NAJAFI, A.; BENSON, J. D. Exogenous melatonin ameliorates the negative effect of osmotic stress in human and bovine ovarian stromal cells. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 6, p. 1054, 2022.
- BARBATO, V. et al. Dynamic in vitro culture of bovine and human ovarian tissue enhances follicle progression and health. **Scientific reports**, v. 13, n. 1, p. 11773, 2023.
- BIZARRO-SILVA, C. et al. Influence of follicle-stimulating hormone concentrations on the integrity and development of bovine follicles cultured in vitro. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 26, n. 5, p. 417–423, 2018.
- CAVALCANTE, B. N. et al. Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during in vitro culture of bovine ovarian tissue. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 54, n. 12, p. 1567–1573, 2019.
- COSTA, F. DAS C. et al. Aloe vera increases collagen fibres in extracellular matrix and mRNA expression of peroxiredoxin-6 in bovine ovarian cortical tissues cultured in vitro. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 30, n. 3, p. 365–372, 2022.
- DEVOS, M.; GROSOBOIS, J.; DEMEESTERE, I. Interaction between PI3K/AKT and Hippo pathways during in vitro follicular activation and response to fragmentation and chemotherapy exposure using a mouse immature ovary model. **Biology of reproduction**, v. 102, n. 3, p. 717–729, 2020.
- DOLMANS, M.-M.; DONNEZ, J.; CACCIOTTOLA, L. Fertility preservation: The challenge of freezing and transplanting ovarian tissue. **Trends in molecular medicine**, v. 27, n. 8, p. 777–791, 2021.
- DUNNING, K. R.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v. 148, n. 1, p. R15-27, 2014.
- FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 1, p. 248–253, 2017.

GROSBOIS, J. et al. Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during in vitro culture. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 38, n. 3, p. 444–458, 2023.

HARTANTI, M. D. et al. Morphometric and gene expression analyses of stromal expansion during development of the bovine fetal ovary. **Reproduction, fertility, and development**, v. 31, n. 3, p. 482–495, 2019.

ISHII, T. et al. Anti-apoptotic effect of acetyl-L-carnitine and L-carnitine in primary cultured neurons. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 83, n. 2, p. 119–124, 2000.

JIANG, X.-D. et al. Regulation of proliferation, apoptosis, hormone secretion and gene expression by acetyl-L-carnitine in yak (*Bos grunniens*) granulosa cells. **Theriogenology**, v. 203, p. 61–68, 2023.

JONES, A. S. K.; SHIKANOV, A. Follicle development as an orchestrated signaling network in a 3D organoid. **Journal of biological engineering**, v. 13, p. 2, 2019.

KINNEAR, H. M. et al. The ovarian stroma as a new frontier. **Reproduction**, v. 160, n. 3, p. R25–R39, 2020.

LI, X. et al. Protective effect of L-carnitine against oxidative stress injury in human ovarian granulosa cells. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 25, n. 4, p. 161, 2023.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods (San Diego, Calif.)**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

NAJAFI, A.; ASADI, E.; BENSON, J. D. Ovarian tissue cryopreservation and transplantation: a review on reactive oxygen species generation and antioxidant therapy. **Cell and tissue research**, v. 393, n. 3, p. 401–423, 2023.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

PAULINO, L. R. F. M. et al. Effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on in vitro development of bovine secondary follicles. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 53, n. 4, p. 997–1005, 2018.

PEI, J. et al. Single-cell transcriptomics analysis reveals a cell atlas and cell communication in yak ovary. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 3, p. 1839, 2023.

PLACIDI, M. et al. Carnitines as mitochondrial modulators of oocyte and embryo bioenergetics. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 4, p. 745, 2022.

QIAN, Y. et al. Acetyl-L-carnitine protects adipose-derived stem cells exposed to H₂O₂ through regulating AMBRA1-related autophagy. **Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. al**, v. 45, n. 1, p. 189–198, 2021.

QIU, M. et al. The influence of ovarian stromal/theca cells during in vitro culture on steroidogenesis, proliferation and apoptosis of granulosa cells derived from the goat ovary. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 49, n. 1, p. 170–176, 2014.

RAJABI, Z.; KHOKHAR, Z.; YAZDEKHASTI, H. The growth of preantral follicles and the impact of different supplementations and circumstances: A review study with focus on bovine and human preantral follicles. **Cellular reprogramming**, v. 20, n. 3, p. 164–177, 2018.

RITTIÉ, L. Method for picosirius red-polarization detection of collagen fibers in tissue sections. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1627, p. 395–407, 2017.

SHAHRI, P. A. K.; CHITI, M. C.; AMORIM, C. A. Isolation and characterization of the human ovarian cell population for transplantation into an artificial ovary. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 39–44, 2019.

SILVA, B. R.; SILVA, J. R. V. Mechanisms of action of non-enzymatic antioxidants to control oxidative stress during in vitro follicle growth, oocyte maturation, and embryo development. **Animal reproduction science**, v. 249, n. 107186, p. 107186, 2023.

SILVA, J. R. V.; ARAÚJO, V.; FIGUEIREDO, J. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 315–326, 2011.

SILVA, R. F. et al. Eugenol improves follicular survival and development during in vitro culture of goat ovarian tissue. **Frontiers in veterinary science**, v. 9, p. 822367, 2022.

STECKIEWICZ, K. P. et al. Shape-depended biological properties of Ag₃PO₄ microparticles: Evaluation of antimicrobial properties and cytotoxicity in in vitro model-safety assessment of potential clinical usage. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 6740325, 2019.

TANG, V. W. Collagen, stiffness, and adhesion: the evolutionary basis of vertebrate mechanobiology. **Molecular biology of the cell**, v. 31, n. 17, p. 1823–1834, 2020.

TAUQIR, S. et al. Acetyl-L-carnitine ameliorates metabolic and endocrine alterations in women with PCOS: A double-blind randomized clinical trial. **Advances in therapy**, v. 38, n. 7, p. 3842–3856, 2021.

TELFER, E. E. et al. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 163, n. 1–2, p. 117–123, 2000.

TELFER, E. E. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 23, n. 5, p. 1151–1158, 2008.

TELFER, E. E.; ZELINSKI, M. B. Ovarian follicle culture: advances and challenges for human and nonhuman primates. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 6, p. 1523–1533, 2013.

THEOCHARIS, A. D. et al. Extracellular matrix structure. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4–27, 2016.

VON MENGDEN, L.; KLAMT, F.; SMITZ, J. Redox biology of human cumulus cells: Basic concepts, impact on oocyte quality, and potential clinical use. **Antioxidants & redox signaling**, v. 32, n. 8, p. 522–535, 2020.

WAGNER, M. et al. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. **Obstetrical & gynecological survey**, v. 75, n. 6, p. 354–355, 2020.

WANG, S. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of acetyl-L-carnitine on atherosclerotic rats. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 26, p. e920250, 2020.

WANG, Z.-J. et al. Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. **Food & function**, v. 8, n. 3, p. 915–926, 2017.

XU, H.-Y. et al. Treatment with acetyl-l-carnitine during in vitro maturation of buffalo oocytes improves oocyte quality and subsequent embryonic development. **Theriogenology**, v. 118, p. 80–89, 2018.

6 CONCLUSÕES GERAIS

- A acetil-L-carnitina, na concentração de 100 μM promove a manutenção da morfologia folicular, assegurando o desenvolvimento dos folículos inclusos em tecido ovariano bovino.
- A acetil-L-carnitina, na concentração de 100 μM promove o aumento da densidade das células estromais no tecido ovariano bovino.

7 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos com a utilização da acetil-L-carnitina durante o cultivo de tecido ovariano bovino, apresentam relevância biotecnológica por terem sido obtidos a partir de estudo realizado por meio da aplicação de cultivo de células animais, podendo usar a espécie bovina como modelo animal, visamos uma aplicação futura também com impacto direto para a espécie humana, ou mesmo o aprimoramento de biotécnicas que já são realizadas. Os componentes do meio de cultivo utilizados neste estudo já vêm sendo investigados quanto à sua eficácia em conjunto ou isoladamente, para que seja possível chegar cada vez mais próximos a um meio eficaz para suprir e mimetizar as necessidades que os organismos têm naturalmente e assim promover o avanço dos estudos e técnicas *in vitro*. O uso da L-carnitina e seus derivados como a acetil-L-carnitina já vem sendo explorado em diversos tipos de células, e o presente estudo pode contribuir para avanços em pesquisas relacionadas a compostos com potencial antioxidante, uma vez que a acetil-L-carnitina demonstrou ser eficiente também nas células estromais, possivelmente devido ao seu potencial de geração de energia por meio de β -oxidação, no entanto, mais estudos se fazem necessários para que os mecanismos de ação sejam melhor compreendidos.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELFATTAH, A. T. et al. Effect of adding L-carnitine to clomiphene resistant PCOs women on the ovulation and the pregnancy rate. **Egyptian Journal of Hospital Medicine**, v. 76, n. 5, p. 4138–4143, 2019.
- ABRAMOV, A. Y.; SCORZIELLO, A.; DUCHEN, M. R. Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 27, n. 5, p. 1129–1138, 2007.
- ADEVA-ANDANY, M. M. et al. Significance of l-carnitine for human health. **IUBMB life**, v. 69, n. 8, p. 578–594, 2017.
- AGARWAL, A.; SENGUPTA, P.; DURAIRAJANAYAGAM, D. Role of L-carnitine in female infertility. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 16, n. 1, p. 5, 2018.
- AGUIAR, F. L. N. et al. FSH supplementation to culture medium is beneficial for activation and survival of preantral follicles enclosed in equine ovarian tissue. **Theriogenology**, v. 85, n. 6, p. 1106–1112, 2016.
- ALBOGAMI, S. The potential inhibitory role of acetyl-L-carnitine on proliferation, migration, and gene expression in HepG2 and HT29 human adenocarcinoma cell lines. **Current issues in molecular biology**, v. 45, n. 3, p. 2393–2408, 2023.
- ALIABADI, E. et al. Effects of L-carnitine and L-acetyl-carnitine on testicular sperm motility and chromatin quality. **Iranian journal of reproductive medicine**, v. 10, n. 2, p. 77–82, 2012.
- AMES, B. N. Delaying the mitochondrial decay of aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1019, n. 1, p. 406–411, 2004.
- ARAÚJO, V. R. et al. In vitro culture of bovine preantral follicles: a review. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 12, n. 1, p. 78, 2014.
- BACI, D. et al. Acetyl-L-Carnitine downregulates invasion (CXCR4/CXCL12, MMP-9) and angiogenesis (VEGF, CXCL8) pathways in prostate cancer cells: rationale for prevention and interception strategies. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 38, n. 1, p. 464, 2019.
- BAIRD, L.; YAMAMOTO, M. The molecular mechanisms regulating the KEAP1-NRF2 pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 40, n. 13, 2020.
- BARBE, A. et al. Effects of grape seed extract and proanthocyanidin B2 on in vitro proliferation, viability, steroidogenesis, oxidative stress, and cell signaling in human granulosa cells. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 17, p. 4215, 2019.

BARBERINO, R. S. et al. Transport of domestic and wild animal ovaries: A review of the effects of medium, temperature, and periods of storage on follicular viability.

Biopreservation and biobanking, v. 17, n. 1, p. 84–90, 2019.

BODAGHI-NAMILEH, V. et al. Acetyl-l-carnitine attenuates arsenic-induced liver injury by abrogation of mitochondrial dysfunction, inflammation, and apoptosis in rats. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 58, p. 11–20, 2018.

BOERRIGTER, M. E. et al. The effect of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on the disappearance of DNA single-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes.

Carcinogenesis, v. 14, n. 10, p. 2131–2136, 1993.

BOURDON, G. et al. Progress and challenges in developing organoids in farm animal species for the study of reproduction and their applications to reproductive biotechnologies.

Veterinary research, v. 52, n. 1, p. 42, 2021.

BRITO, I. R. et al. Three-dimensional systems for in vitro follicular culture: overview of alginate-based matrices. **Reproduction, fertility, and development**, v. 26, n. 7, p. 915–930, 2014.

CACCIOTTOLA, L.; DONNEZ, J.; DOLMANS, M.-M. Ovarian tissue damage after grafting: systematic review of strategies to improve follicle outcomes. **Reproductive biomedicine online**, v. 43, n. 3, p. 351–369, 2021.

CAGLAYAN, A. et al. Impaired antioxidant enzyme functions with increased lipid peroxidation in epithelial ovarian cancer. **IUBMB life**, v. 69, n. 10, p. 802–813, 2017.

CALABRESE, V. et al. Acetylcarnitine induces heme oxygenase in rat astrocytes and protects against oxidative stress: involvement of the transcription factor Nrf2. **Journal of neuroscience research**, v. 79, n. 4, p. 509–521, 2005.

CALÒ, L. A. et al. Antioxidant effect of L-carnitine and its short chain esters: relevance for the protection from oxidative stress related cardiovascular damage. **International journal of cardiology**, v. 107, n. 1, p. 54–60, 2006.

CANDELARIA, J. I.; DENICOL, A. C. Characterization of isolated bovine preantral follicles based on morphology, diameter and cell number. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 28, n. 2, p. 1–6, 2020.

CARRILLO-GONZÁLEZ, D. F. et al. L-carnitine supplementation during in vitro maturation and in vitro culture does not affect the survival rates after vitrification and warming but alters inf-T and ptgs2 gene expression. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 16, p. 5601, 2020.

CARRILLO-GONZÁLEZ, D. F.; HERNÁNDEZ-HERRERA, D. Y.; MALDONADO-ESTRADA, J. G. The role of L-carnitine in bovine embryo metabolism. A review of the effect of supplementation with a metabolic modulator on in vitro embryo production. **Animal biotechnology**, v. 34, n. 2, p. 413–423, 2023.

CAVALCANTE, B. N. et al. Effects of melatonin on morphology and development of primordial follicles during in vitro culture of bovine ovarian tissue. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 54, n. 12, p. 1567–1573, 2019.

CAVALLINI, G. et al. Cinnoxiam and L-carnitine/acetyl-L-carnitine treatment for idiopathic and varicocele-associated oligoasthenospermia. **Journal of andrology**, v. 25, n. 5, p. 761–70; discussion 771-2, 2004.

CHAN, A.; SHEA, T. B. Effects of dietary supplementation with N-acetyl cysteine, acetyl-L-carnitine and S-adenosyl methionine on cognitive performance and aggression in normal mice and mice expressing human ApoE4. **Neuromolecular medicine**, v. 9, n. 3, p. 264–269, 2007.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERIS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. **Physiological reviews**, v. 59, n. 3, p. 527–605, 1979.

CHELIKANI, P.; FITA, I.; LOEWEN, P. C. Diversity of structures and properties among catalases. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 61, n. 2, p. 192–208, 2004.

CHENG H.-J.; CHEN T. Clinical efficacy of combined L-carnitine and acetyl-L-carnitine on idiopathic asthenospermia. **Zhonghua nan ke xue [National journal of andrology]**, v. 14, n. 2, p. 149–151, 2008.

CHOE, C. et al. Synergistic effects of glutathione and β -mercaptoethanol treatment during in vitro maturation of porcine oocytes on early embryonic development in a culture system supplemented with L-cysteine. **The Journal of reproduction and development**, v. 56, n. 6, p. 575–582, 2010.

CHOWDHURY, M. M. R. et al. Improved developmental competence in embryos treated with lycopene during in vitro culture system. **Molecular reproduction and development**, v. 85, n. 1, p. 46–61, 2018.

COMIZZOLI, P. et al. Advances in reproductive science for wild carnivore conservation. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 44 Suppl 2, n. s2, p. 47–52, 2009.

DA CUNHA, E. V. et al. Effect of bone morphogenetic proteins 2 and 4 on survival and development of bovine secondary follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 110, p. 44–51, 2018.

DE MORAES, F. P. et al. Local regulation of antral follicle development and ovulation in monovulatory species. **Animal Reproduction**, v. 19, n. 4, p. e20220099, 2022.

DI CESARE MANNELLI, L. et al. Protective effect of acetyl-L-carnitine on the apoptotic pathway of peripheral neuropathy: Peripheral neuropathy: antiapoptotic role of ALCAR. **The European journal of neuroscience**, v. 26, n. 4, p. 820–827, 2007.

DI EMIDIO, G. et al. Regulatory functions of L-carnitine, acetyl, and propionyl L-carnitine in a PCOS mouse model: Focus on antioxidant/antiglycative molecular pathways in the ovarian microenvironment. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 9, p. 867, 2020.

DOKMECI, D. et al. L-carnitine inhibits ethanol-induced gastric mucosal injury in rats. **Pharmacological reports: PR**, v. 57, n. 4, p. 481–488, 2005.

DULEBA, A. J. et al. Proliferation of ovarian theca-interstitial cells is modulated by antioxidants and oxidative stress. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 19, n. 7, p. 1519–1524, 2004.

DUNNING, K. R.; RUSSELL, D. L.; ROBKER, R. L. Lipids and oocyte developmental competence: the role of fatty acids and β -oxidation. **Reproduction**, v. 148, n. 1, p. R15-27, 2014.

ELMORSY, E. et al. The role of oxidative stress in antipsychotics induced ovarian toxicity. **Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA**, v. 44, p. 190–195, 2017.

ENGEL, A. G.; REBOUCHE, C. J. Carnitine metabolism and inborn errors. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 7 Suppl 1, p. 38–43, 1984.

FATHIZADEH, H. et al. The effects of L-carnitine supplementation on indicators of inflammation and oxidative stress: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of diabetes and metabolic disorders**, v. 19, n. 2, p. 1879–1894, 2020.

FELGUEIRAS, J. et al. State-of-the-art in reproductive bench science: Hurdles and new technological solutions. **Theriogenology**, v. 150, p. 34–40, 2020.

FERST, J. G. et al. Intrafollicular injection of nonesterified fatty acids impaired dominant follicle growth in cattle. **Animal reproduction science**, v. 219, n. 106536, p. 106536, 2020.

FIGUEIREDO, J. R. DE et al. Advances in in vitro folliculogenesis in domestic ruminants. **Animal Reproduction**, v. 16, n. 1, p. 52–65, 2019.

FIGUEIREDO, J. R.; LIMA, L. F. Tecnologia do ovário artificial: aplicações, estado da arte, limitações e perspectivas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, n. 1, p. 248–253, 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). FAOSTAT Statistical Database – Production – Live Animals. 2021a. Disponível em: <<http://www.fao.org/faostat/en/?#data/QA>>. Acesso em: 10 mar. 2022.

FRANCÉS-HERRERO, E. et al. Bioengineering trends in female reproduction: a systematic review. **Human reproduction update**, v. 28, n. 6, p. 798–837, 2022.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual review of biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 97–112, 1995.

GAI, H.-F. et al. Ovarian damages produced by aerosolized fine particulate matter (PM_{2.5}) pollution in mice: Possible protective medications and mechanisms: Possible protective medications and mechanisms. **Chinese medical journal**, v. 130, n. 12, p. 1400–1410, 2017.

GARDNER, D. K. et al. Prospective randomized multicentre comparison on sibling oocytes comparing G-Series media system with antioxidants versus standard G-Series media system. **Reproductive biomedicine online**, v. 40, n. 5, p. 637–644, 2020.

GOUVEIA, B. B. et al. Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles. **Theriogenology**, v. 86, n. 5, p. 1275–1284, 2016.

GROSBOIS, J. et al. Spatio-temporal remodelling of the composition and architecture of the human ovarian cortical extracellular matrix during in vitro culture. **Human reproduction (Oxford, England)**, v. 38, n. 3, p. 444–458, 2023.

GÜLÇİN, I. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. **Life sciences**, v. 78, n. 8, p. 803–811, 2006.

GUO, Y. et al. Ovarian microenvironment: challenges and opportunities in protecting against chemotherapy-associated ovarian damage. **Human reproduction update**, v. 30, n. 5, p. 614–647, 2024.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**, v. 141, n. 2, p. 312–322, 2006.

HASSOUN, E. A.; VODHANEL, J.; ABUSHABAN, A. The modulatory effects of ellagic acid and vitamin E succinate on TCDD-induced oxidative stress in different brain regions of rats after subchronic exposure. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, v. 18, n. 4, p. 196–203, 2004.

HE, J. et al. Vitamin C reduces vancomycin-related nephrotoxicity through the inhibition of oxidative stress, apoptosis, and inflammation in mice. **Annals of translational medicine**, v. 9, n. 16, p. 1319, 2021.

HIGUCHI, C. M. et al. A simplified method for three-dimensional (3-D) ovarian tissue culture yielding oocytes competent to produce full-term offspring in mice. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0143114, 2015.

HOPPEL, C. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. **American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation**, v. 41, n. 4 Suppl 4, p. S4-12, 2003.

HSU, J. et al. Carnitine octanoyltransferase is important for the assimilation of exogenous acetyl-L-carnitine into acetyl-CoA in mammalian cells. **The journal of biological chemistry**, v. 299, n. 2, p. 102848, 2023.

HU, B. et al. Prospects for fertility preservation: the ovarian organ function reconstruction techniques for oogenesis, growth and maturation in vitro. **Frontiers in physiology**, v. 14, p. 1177443, 2023.

ISHII, T. et al. Anti-apoptotic effect of acetyl-l-carnitine and l-carnitine in primary cultured neurons. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 83, n. 2, p. 119–124, 2000.

JHALA, D. D.; CHINOY, N. J.; RAO, M. V. Mitigating effects of some antidotes on fluoride and arsenic induced free radical toxicity in mice ovary. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 46, n. 3, p. 1138–1142, 2008.

JIANG, W.-J. et al. L-carnitine prevents bovine oocyte aging and promotes subsequent embryonic development. **The Journal of reproduction and development**, v. 65, n. 6, p. 499–506, 2019.

JOHNSON, F.; GIULIVI, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 4–5, p. 340–352, 2005.

JURASZEK, B.; NAŁĘCZ, K. A. SLC22A5 (OCTN2) carnitine transporter-indispensable for cell metabolism, a Jekyll and Hyde of human cancer. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 1, p. 14, 2019.

KERNER, J.; HOPPEL, C. Genetic disorders of carnitine metabolism and their nutritional management. **Annual review of nutrition**, v. 18, n. 1, p. 179–206, 1998.

KHAN, A. et al. Evaluation of heat stress effects on cellular and transcriptional adaptation of bovine granulosa cells. **Journal of animal science and biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 25, 2020.

KIM, B. et al. PGC1 α induced by reactive oxygen species contributes to chemoresistance of ovarian cancer cells. **Oncotarget**, v. 8, n. 36, p. 60299–60311, 2017.

KOOHPEYMA, F. et al. The effects of L-carnitine on renal function and gene expression of caspase-9 and Bcl-2 in monosodium glutamate-induced rats. **BMC nephrology**, v. 22, n. 1, p. 162, 2021.

KREJBICH, P.; BIRRINGER, M. The self-administered use of complementary and alternative medicine (CAM) supplements and antioxidants in cancer therapy and the critical role of Nrf-2-A systematic review. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 11, p. 2149, 2022.

LI, J. et al. Biological roles of l-carnitine in oocyte and early embryo development. **Molecular reproduction and development**, v. 88, n. 10, p. 673–685, 2021.

LI, X. et al. Protective effect of L-carnitine against oxidative stress injury in human ovarian granulosa cells. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 25, n. 4, p. 161, 2023.

LIU, J. et al. Comparison of the effects of L-carnitine and acetyl-L-carnitine on carnitine levels, ambulatory activity, and oxidative stress biomarkers in the brain of old rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1033, n. 1, p. 117–131, 2004.

LIU, S. et al. L-carnitine ameliorates cancer cachexia in mice by regulating the expression and activity of carnitine palmityl transferase. **Cancer biology & therapy**, v. 12, n. 2, p. 125–130, 2011.

LONGO, N.; AMAT DI SAN FILIPPO, C.; PASQUALI, M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. **American journal of medical genetics. Part C, Seminars in medical genetics**, v. 142C, n. 2, p. 77–85, 2006.

LONGO, N.; FRIGENI, M.; PASQUALI, M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1863, n. 10, p. 2422–2435, 2016.

LU, J. et al. A novel and compact review on the role of oxidative stress in female reproduction. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 16, n. 1, p. 80, 2018.

LU, Q.; ZHANG, Y.; ELISSEEFF, J. H. Carnitine and acetylcarnitine modulate mesenchymal differentiation of adult stem cells: Carnitine modulates stem cell differentiation. **Journal of tissue engineering and regenerative medicine**, v. 9, n. 12, p. 1352–1362, 2015.

MARKLUND, S. L. Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 79, n. 24, p. 7634–7638, 1982.

MARKLUND, S. L.; HOLME, E.; HELLNER, L. Superoxide dismutase in extracellular fluids. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, v. 126, n. 1, p. 41–51, 1982.

MBEMYA, G. T. et al. Early ovine preantral follicles have a potential to grow until antral stage in two-step culture system in the presence of aqueous extract of *Justicia insularis*. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 54, n. 8, p. 1121–1130, 2019.

MCGARRY, J. D.; BROWN, N. F. The mitochondrial carnitine palmitoyltransferase system. From concept to molecular analysis. **European journal of biochemistry**, v. 244, n. 1, p. 1–14, 1997.

MILLS, G. C. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. **The journal of biological chemistry**, v. 229, n. 1, p. 189–197, 1957.

MODAK, A. K. et al. L-carnitine supports the in vitro growth of buffalo oocytes. **Animals: an open access journal from MDPI**, v. 12, n. 15, p. 1957, 2022.

MOHAMMAD-BAGHER, G. et al. Synergistic effects of acetyl-L-carnitine and adipose-derived stromal cells on improving regenerative capacity of acellular nerve allograft in sciatic nerve defect. **The journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 368, n. 3, p. 490–502, 2019.

MOMENZADEH, M. et al. Acetyl-L-carnitine for the prevention of taxane-induced neuropathy in patients with breast cancer: a systematic review and meta-analysis: A systematic review and meta-analysis. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 18, n. 2, p. 112–120, 2023.

MOREIRA, H. L. et al. Breeding goals and economic values for Nellore cattle in a full-cycle production system. **Acta scientiarum. Animal sciences**, v. 41, n. 1, p. 43361, 2019.

MUELLER, M. L.; VAN EENENNAAM, A. L. Synergistic power of genomic selection, assisted reproductive technologies, and gene editing to drive genetic improvement of cattle. **CABI agriculture and bioscience**, v. 3, n. 1, 2022.

NAŁECZ, K. A. et al. Carnitine: transport and physiological functions in the brain. **Molecular aspects of medicine**, v. 25, n. 5–6, p. 551–567, 2004.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

NISHIKIMI, M.; YAGI, K. Biochemistry and molecular biology of ascorbic acid biosynthesis. **Sub-cellular biochemistry**, v. 25, p. 17–39, 1996.

NOGUEIRA, É.; MINGOTI, G. Z.; NICACIO, A. C. Biotécnicas reprodutivas para aceleração do melhoramento genético. *Melhoramento Genético Aplicado para Gado de corte - Programa Geneplus - Embrapa*. p. 210–227, 2013.

PAIS, A. S. et al. The challenge of ovarian tissue culture: 2D versus 3D culture. **Journal of ovarian research**, v. 14, n. 1, p. 147, 2021.

PALMERINI, M. G. et al. Modulating morphological and redox/glycative alterations in the PCOS uterus: Effects of carnitines in PCOS mice. **Biomedicines**, v. 11, n. 2, p. 374, 2023.

PAN, T. et al. Acetyl l-carnitine protects adipose-derived stem cells against serum-starvation: regulation on the network composed of reactive oxygen species, autophagy, apoptosis and senescence. **Cytotechnology**, v. 74, n. 1, p. 105–121, 2022.

PAULINO, L. R. F. M. et al. Effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on in vitro development of bovine secondary follicles. **Zuchthygiene [Reproduction in domestic animals]**, v. 53, n. 4, p. 997–1005, 2018.

PAULINO, L. R. F. M. et al. Effects of epidermal growth factor and progesterone on development, ultrastructure and gene expression of bovine secondary follicles cultured in vitro. **Theriogenology**, v. 142, p. 284–290, 2020.

PAULINO, L. R. F. M. et al. Immunolocalization of melatonin receptors in bovine ovarian follicles and in vitro effects of melatonin on growth, viability and gene expression in secondary follicles. **Domestic animal endocrinology**, v. 81, n. 106750, p. 106750, 2022.

PEI, J. et al. Single-cell transcriptomics analysis reveals a cell atlas and cell communication in yak ovary. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 3, p. 1839, 2023.

PELUSO, G. et al. Cancer and anticancer therapy-induced modifications on metabolism mediated by carnitine system. **Journal of cellular physiology**, v. 182, n. 3, p. 339–350, 2000.

PETTEGREW, J. W.; LEVINE, J.; MCCLURE, R. J. Acetyl-L-carnitine physical-chemical, metabolic, and therapeutic properties: relevance for its mode of action in Alzheimer's disease and geriatric depression. **Molecular psychiatry**, v. 5, n. 6, p. 616–632, 2000.

PICTON, H. M. et al. The in vitro growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, n. 6, p. 703–715, 2008.

PLACIDI, M. et al. Carnitines as mitochondrial modulators of oocyte and embryo bioenergetics. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 4, p. 745, 2022.

QIAN, Y. et al. Acetyl-L-carnitine protects adipose-derived stem cells exposed to H₂O₂ through regulating AMBRA1-related autophagy. **Biocell: official journal of the Sociedades Latinoamericanas de Microscopia Electronica ... et. al**, v. 45, n. 1, p. 189–198, 2021.

RAKHA, S. I. et al. Importance of antioxidant supplementation during in vitro maturation of mammalian oocytes. **Veterinary sciences**, v. 9, n. 8, p. 439, 2022.

ROSSETTO, R. et al. Effect of medium composition on the in vitro culture of bovine pre-antral follicles: morphology and viability do not guarantee functionality. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 21, n. 2, p. 125–128, 2013.

SAHEBKAR, A. et al. Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Journal of functional foods**, v. 18, p. 898–909, 2015.

SANTOS, J. M. S. et al. Kaempferol can be used as the single antioxidant in the in vitro culture medium, stimulating sheep secondary follicle development through the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. **Theriogenology**, v. 136, p. 86–94, 2019.

SANTOS, R. R.; SCHOEVERS, E. J.; ROELEN, B. A. J. Usefulness of bovine and porcine IVM/IVF models for reproductive toxicology. **Reproductive biology and endocrinology: RB&E**, v. 12, n. 1, p. 117, 2014.

SARAWI, W. S. et al. Nano-curcumin prevents copper reproductive toxicity by attenuating oxidative stress and inflammation and improving Nrf2/HO-1 signaling and pituitary-gonadal axis in male rats. **Toxics**, v. 10, n. 7, p. 356, 2022.

SARGAZI, Z. et al. The protective effect of vitamin E on rats' ovarian follicles following an administration of diazinon: An experimental study. **International journal of reproductive biomedicine (Yazd, Iran)**, v. 17, n. 2, p. 79, 2019.

SARMA, U. C.; FINDLAY, J. K.; HUTT, K. J. Oocytes from stem cells. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v. 55, p. 14–22, 2019.

SATTA, S. et al. The role of Nrf2 in cardiovascular function and disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2017, p. 9237263, 2017.

SCHNEIDER, C. Chemistry and biology of vitamin E. **Molecular nutrition & food research**, v. 49, n. 1, p. 7–30, 2005.

SCHRADER, M. et al. Peroxisome-mitochondria interplay and disease. **Journal of inherited metabolic disease**, v. 38, n. 4, p. 681–702, 2015.

SEPAND, M. R. et al. Effect of acetyl-L-carnitine on antioxidant status, lipid peroxidation, and oxidative damage of arsenic in rat. **Biological trace element research**, v. 171, n. 1, p. 107–115, 2016.

SHAFIEI, G. et al. l-carnitine reduces the adverse effects of ROS and up-regulates the expression of implantation related genes in in vitro developed mouse embryos. **Theriogenology**, v. 145, p. 59–66, 2020.

SHOOREI, H. et al. Effects of Matricaria chamomilla extract on growth and maturation of isolated mouse ovarian follicles in a three-dimensional culture system. **Chinese medical journal**, v. 131, n. 2, p. 218–225, 2018.

SILVA, B. R.; SILVA, J. R. V. Mechanisms of action of non-enzymatic antioxidants to control oxidative stress during in vitro follicle growth, oocyte maturation, and embryo development. **Animal reproduction science**, v. 249, n. 107186, p. 107186, 2023.

SILVA, G. M. et al. In vitro development of secondary follicles from pre-pubertal and adult goats cultured in two-dimensional or three-dimensional systems. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 23, n. 4, p. 475–484, 2015.

SILVA, J. R. V.; ARAÚJO, V.; FIGUEIREDO, J. Papel dos antioxidantes no cultivo in vitro de células ovarianas. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 3, p. 315–332, 2011.

SILVA, R. F. et al. Eugenol improves follicular survival and development during in vitro culture of goat ovarian tissue. **Frontiers in veterinary science**, v. 9, p. 822367, 2022.

SOARES, A. S.; MARTINS, V. O.; BRITO, S. DOS S. BOVINOCULTURA: CARACTERIZAÇÃO DO SISTEMA PRODUTIVO NO DISTRITO MACAÚBA, ARAGUATINS (TO). **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 12, n. 3, p. 901, 2019.

SOTO-HERAS, S.; PARAMIO, M.-T. Impact of oxidative stress on oocyte competence for in vitro embryo production programs. **Research in veterinary science**, v. 132, p. 342–350, 2020.

STECKIEWICZ, K. P. et al. Shape-depended biological properties of Ag₃PO₄ microparticles: Evaluation of antimicrobial properties and cytotoxicity in in vitro model-safety assessment of potential clinical usage. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 6740325, 2019.

SZYMAŃSKI, M. et al. Comparison of 3- and 6-month outcomes of combined oral L-carnitine fumarate and acetyl-L-carnitine therapy, included in an antioxidant formulation, in patients with idiopathic infertility. **American journal of men's health**, v. 15, n. 5, p. 15579883211036790, 2021.

TAKAHASHI, M. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. **The Journal of reproduction and development**, v. 58, n. 1, p. 1–9, 2012.

TALENEZHAD, N. et al. Effects of l-carnitine supplementation on weight loss and body composition: A systematic review and meta-analysis of 37 randomized controlled clinical trials with dose-response analysis. **Clinical nutrition ESPEN**, v. 37, p. 9–23, 2020.

TANG, V. W. Collagen, stiffness, and adhesion: the evolutionary basis of vertebrate mechanobiology. **Molecular biology of the cell**, v. 31, n. 17, p. 1823–1834, 2020.

TAUQIR, S. et al. Acetyl-L-carnitine ameliorates metabolic and endocrine alterations in women with PCOS: A double-blind randomized clinical trial. **Advances in therapy**, v. 38, n. 7, p. 3842–3856, 2021.

TELFER, E. E. et al. In vitro development of oocytes from porcine and bovine primary follicles. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 163, n. 1–2, p. 117–123, 2000.

TERAO, H. et al. Role of oxidative stress in follicular fluid on embryos of patients undergoing assisted reproductive technology treatment: Role of OS on fertility in ART. **The journal of obstetrics and gynaecology research**, v. 45, n. 9, p. 1884–1891, 2019.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v. 63, n. 6, p. 1717–1751, 2005.

VANACKER, J.; AMORIM, C. A. Alginate: A versatile biomaterial to encapsulate isolated ovarian follicles. **Annals of biomedical engineering**, v. 45, n. 7, p. 1633–1649, 2017.

VASCONCELOS, E. M. et al. Eugenol influences the expression of messenger RNAs for superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 in bovine secondary follicles cultured in vitro. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 29, n. 4, p. 301–306, 2021.

VENDITTI, P.; DI MEO, S. The role of reactive oxygen species in the life cycle of the mitochondrion. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 6, p. 2173, 2020.

VILELA, J. DE M. V.; DOLMANS, M.-M.; AMORIM, C. A. Ovarian tissue transportation: a systematic review. **Reproductive biomedicine online**, v. 42, n. 2, p. 351–365, 2021.

VIOLANTE, S. et al. Peroxisomes contribute to the acylcarnitine production when the carnitine shuttle is deficient. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1831, n. 9, p. 1467–1474, 2013.

VON MENGDEN, L.; KLAMT, F.; SMITZ, J. Redox biology of human cumulus cells: Basic concepts, impact on oocyte quality, and potential clinical use. **Antioxidants & redox signaling**, v. 32, n. 8, p. 522–535, 2020.

WANG, M. et al. Carnitine palmitoyltransferase system: A new target for anti-inflammatory and anticancer therapy? **Frontiers in pharmacology**, v. 12, p. 760581, 2021.

WANG, S. et al. Anti-inflammatory and antioxidant effects of acetyl-L-carnitine on atherosclerotic rats. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 26, p. e920250, 2020.

WANG, Z.-J. et al. Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. **Food & function**, v. 8, n. 3, p. 915–926, 2017.

WEISIGER, R. A.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. Organelle specificity. **The journal of biological chemistry**, v. 248, n. 10, p. 3582–3592, 1973.

XU, H.-Y. et al. Maturation of buffalo oocytes in vitro with acetyl-L-carnitine improves cryotolerance due to changes in mitochondrial function and the membrane lipid profile. **Reproduction, fertility, and development**, v. 31, n. 2, p. 386–394, 2019.

YAN, F. et al. The role of oxidative stress in ovarian aging: a review. **Journal of ovarian research**, v. 15, n. 1, p. 100, 2022.

YANG, T. et al. Lipid metabolism and endometrial receptivity. **Human reproduction update**, v. 28, n. 6, p. 858–889, 2022.

YE, J. et al. L-carnitine attenuates oxidant injury in HK-2 cells via ROS-mitochondria pathway. **Regulatory peptides**, v. 161, n. 1–3, p. 58–66, 2010.

YOU, J. et al. 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, n. 2, p. 235–243, 2012.

ZHAO, X.-M. et al. Melatonin enhances the in vitro maturation and developmental potential of bovine oocytes denuded of the cumulus oophorus. **Zygote (Cambridge, England)**, v. 23, n. 4, p. 525–536, 2015.

ZOLINI, A. M. et al. Effect of addition of l-carnitine to media for oocyte maturation and embryo culture on development and cryotolerance of bovine embryos produced in vitro. **Theriogenology**, v. 133, p. 135–143, 2019.

ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
Campus de Sobral – Faculdade de Medicina
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado: **"Influência da acetil-L-carnitina no desenvolvimento de folículos ovarianos bovinos cultivados *in vitro*"**, registrado como **Protocolo CEUA UFC Sobral nº 03/22**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. José Roberto Viana Silva**, envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino). O projeto encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), sendo aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Campus da UFC em Sobral, em cumprimento à deliberação registrada na terceira reunião ordinária de 03/05/2022.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/05/2022 até 30/04/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Bos taurus</i> / Bovino de corte
Nº de animais	50 (cinquenta)
Peso/Idade	400 kg / 3-8 anos
Sexo	Fêmeas (♀)
Origem	Abatedouro Vasconcelos & Cavalcante Ltda CNPJ: 12.134.855/0002-75 CRMV: CE-00962-VP ART: 698612

Sobral, 03 de maio de 2022.


Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva
Professor de Registro Superior
Curso de Odontologia - 1800 (11)
UFC - Campus Sobral

Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA