



A L-arginina na produção *in vitro* de embriões bovinos: perspectivas para o futuro

L-arginine in the in vitro production of bovine embryos: perspectives for the future

Maria Clara Caldas-Bussiere¹, Valter Luiz Maciel Jr², Vinicius Maretto¹

¹Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal, Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Avenida Alberto Lamego, 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, Brasil, CEP: 28013-602

²Departamento de Cirurgia, Laboratório de Estudos Avançados em Fertilidade, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil

Resumo

A L-arginina (L-arg) é o principal precursor da síntese do NO, contudo, é precursora também da síntese de creatina, agmatina, ureia, síntese proteica, L-ornitina, poliaminas, L-prolina e L-glutamato. Nesta breve revisão, vamos falar de alguns resultados que estão sendo obtidos sobre o papel da L-arg na capacitação de espermatozoides bovinos e seu impacto na produção *in vitro* de embriões. Estudos *in vitro* mostraram que a adição de L-arg ao meio de capacitação espermática está associada a um aumento na produção de NO, que se correlaciona com aumento da motilidade e vigor, integridade da membrana plasmática e acrossomal, atividade mitocondrial, capacitação espermática, peroxidação lipídica, bem como com a produção de blastocistos. Além disso, a adição da L-arg ao meio de capacitação *in vitro*, altera o perfil de proteínas importantes ligadas ao processo de capacitação, fertilização e desenvolvimento embrionário inicial. Estes efeitos da L-arg são GMPc dependentes e independentes. Na maturação *in vitro*, entretanto, embora já tenham sido encontrados bons resultados com o uso do L-arg, mais estudos são necessários para determinar a concentração ideal a ser adicionada ao meio de maturação *in vitro* e seu impacto na produção de blastocistos. Visto que a pré-capacitação de espermatozoides induzida pela heparina em presença de L-arg foi o método mais eficiente na produção *in vitro* de embriões, sugerimos sua utilização. Mais pesquisas sobre o metabolismo da L-arg no espermatozoide e CCOs de bovinos durante eventos ligados à fertilização são necessários para se identificar novas vias que atuem nestas etapas *in vitro* visando o aumento da percentagem e qualidade de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

Palavras-chave: pré-capacitação espermática, óxido nítrico, produção *in vitro* de blastocistos, GMPc.

Abstract

L-arginine (L-arg) is the main source of NO synthesis; however, it is also a precursor of the synthesis of creatine, agmatine, urea, protein synthesis, L-ornithine, polyamines, L-proline, and L-glutamate. In this brief review, we will discuss some results obtained previously about the role of L-arg in the capacitation of bovine sperm and its impact on in vitro embryo production. In vitro studies have shown that the addition of L-arg to the sperm capacitation medium is associated with an increase in NO production, which in controlled levels is related to an increased motility and vigor, plasma and acrosomal membrane integrity, mitochondrial activity, sperm capacitation, peroxidation lipids, as well as with the blastocyst production. Furthermore, the addition of L-arg to the in vitro capacitation medium alters the profile of important proteins linked to the capacitation process, fertilization, and early embryonic development. These effects of L-arg are cGMP dependent and independent. In in vitro maturation, however, although good results have already been found with the use of L-arg, further studies are needed to determine the ideal concentration to be added to the in vitro maturation medium and its impact on the production of blastocysts. Since heparin-induced pre-capacitation of spermatozoa in the presence of L-arg was the most efficient method for in vitro embryo production, we suggest its use. More research on L-arg metabolism in bovine sperm and OCCs during events related to fertilization is needed to identify new pathways that act in these in vitro steps aiming to increase the percentage and quality of bovine embryos produced in vitro.

Keywords: Pre-capacitation of sperm, nitric oxide, in vitro embryo production, cGMP

¹Correspondência: mariaclaracaldasbussiere@gmail.com

Recebido: 09 de novembro de 2021

Aceito: 28 de dezembro de 2021



Introdução

A L-arg é um aminoácido semi-essencial, precursor de importantes metabólitos, como o óxido nítrico e as poliaminas (URICH *et al.*, 2019). A disponibilidade de L-arg para a síntese de NO no meio usado para cultivar células é um dos pontos principais no controle da síntese de NO *in vitro* (Ignarro, 2000; Leal *et al.*, 2009).

Diversos estudos vêm demonstrando que a arginina desempenha um papel crucial na reprodução (Wu *et al.*, 2013) e desenvolvimento fetal (Wu *et al.*, 2013; Rodrigues-Krause *et al.*, 2018; Che *et al.*, 2019) em suínos (Mateo *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2014), ratos (Zeng *et al.*, 2008) e em equinos (Aurich *et al.*, 2019). Em ruminantes, poucas informações sobre os efeitos da suplementação de L-arg na função reprodutiva estão disponíveis (Chavez *et al.*, 2015).

Estudos *in vitro* demonstraram que a adição de L-arg ao meio de fertilização está associada a um aumento na produção de NO, que se correlaciona com uma melhoria nos parâmetros de capacitação espermática e melhora do potencial fértil de várias espécies, incluindo camundongos (Herrero *et al.*, 1996), suínos (Aquila *et al.*, 2011), humanos (Wang *et al.*, 2014) e bovinos (O'Flaherty *et al.*, 2004; Rodriguez *et al.*, 2005; Leal *et al.*, 2009; Santana *et al.*, 2016; Aguiar *et al.*, 2019), bem como altera o perfil proteômico de espermatozoides bovinos (Maciel Jr *et al.*, 2018).

A atuação do NO na maturação de oócitos bovinos foi demonstrada pela presença de diferentes isoformas da NOS, especialmente endotelial (eNOS) e induzível (iNOS), em oócitos e em células somáticas do ovário (Tsfaye *et al.*, 2006; Pires *et al.*, 2009). Em nossos estudos, demonstramos que alterações na concentração de NO no meio de maturação *in vitro* devido à suplementação com doador de NO (Viana *et al.*, 2007; Viana, *et al.*, 2011) ou inibidor da atividade da NOS (Matta *et al.*, 2009) afetaram a retomada e a progressão da meiose (Dubeibe *et al.*, 2017). Além disso, vimos que oócitos maturados *in vitro* em meio suplementado com L-arg apresentam maior integridade das células do *cumulus* e melhores índices de maturação na presença de hemisseções da parede folicular (Dubeibe *et al.*, 2017).

Portanto, o objetivo do presente trabalho é revisar os efeitos da suplementação com L-arg na pré-capacitação espermática, maturação *in vitro* e, por consequência, seus efeitos na produção *in vitro* de embriões bovinos e estabelecer perspectivas para estudos futuros.

L-Arginina

Metabolismo

A L-arginina (L-arg, ácido 2-amino-5-guanidinovalérico) é o isômero fisiologicamente ativo da arginina, comparado com o D-isômero, sendo assim, é utilizada na suplementação tanto *in vitro*, como *in vivo* (Wu e Morris, 1998). É um aminoácido catiônico, sendo considerado na maioria dos animais, como um aminoácido semiessencial, devido ao fato que a síntese *de novo* da L-arg e *turnover* proteico não sustentam adequadamente o seu suprimento, principalmente em condições de alta demanda como crescimento, cicatrização de feridas (Barbul, 1986; Jenkinson *et al.*, 1986), gestação (Weckman *et al.*, 2019), dentre outras funções. A L-arg está envolvida como substrato funcional na síntese de creatina, agmatina, ureia, síntese proteica, L-ornitina, poliaminas (putrescina, espermina e spermidina), L-glutamato e L-prolina. (Wu e Morris, 1998). Em algumas células, mas não em todas, o L-glutamato, a L-prolina, L-ornitina e L-citrulina participam da síntese *de novo* da L-arg (Ignarro, 2000). Muito pouco se sabe sobre o metabolismo da L-arg em espermatozoides e complexos *cumulus*-oócitos de bovinos.

Disponibilidade

Em células que produzem NO, o transporte da L-arg é predominantemente mediado via difusão facilitada por meio do sistema CAT [proteínas carreadoras preferencialmente de aminoácidos (CAA)]. Consequentemente, outros aminoácidos catiônicos e análogos de CAA competem com a L-arg pelo transporte, via estas proteínas, sendo um CAA trocado por outro CAA. Assim, a concentração intracelular de L-arg poderá depender não somente da concentração extracelular, mas também da concentração de outros CAA (Ignarro, 2000).

A disponibilidade de L-arg para síntese de NO e demais metabólitos é determinada por 5 fatores: 1) suprimento exógeno (ingestão na dieta por animais intactos ou concentração no meio usado no cultivo celular), 2) liberação endógena via degradação proteica, 3) síntese de arginina endógena, 4) catabolismo e 5) transporte da arginina. A complexidade aumenta pelo fato de que a relativa contribuição de cada de um

destes fatores para a disponibilidade de L-arg total não é a mesma em todos os tipos de células, e eles podem variar consideravelmente durante o desenvolvimento e em resposta a vários estímulos, incluindo aqueles que regulam a síntese de NO. *In vivo*, a síntese de L-arg ocorre no intestino delgado e rins. O que é sintetizado no fígado, é rapidamente hidrolisado para ornitina e ureia. Somente 5 a 15% da arginina plasmática tem origem da sua síntese em adultos saudáveis, indicando que a maioria da arginina plasmática é de origem da degradação de proteínas e da dieta. Em animais em crescimento, a síntese de arginina pode contribuir com ~30% da arginina plasmática (Ignaro, 2000).

Ação

Espermatozoide

Conforme revisado anteriormente (de Lamirande e Gagnon, 1994), desde a década de 90, estudos já demonstravam uma dupla ação das chamadas espécies reativas de oxigênio (EROs) sobre os espermatozoides e dentre elas, o NO. Esses estudos nos permitiram entender que em concentrações elevadas, o NO e outras EROs influenciam negativamente funções essenciais espermáticas, principalmente em decorrência do estresse oxidativo. Esse estresse oxidativo está relacionado a um declínio do potencial fértil espermático, por afetar características importantes como a motilidade espermática, integridade e funcionalidade do acrossoma e aumento da fragmentação de DNA. Apesar disso, em baixas concentrações de EROs são importantes à fisiologia espermática (Buzadzic *et al.*, 2015). Três EROs são comprovadamente importantes ao espermatozoide, pois possuem efeito positivo na chamada ativação espermática (hipermotilidade, capacitação e reação acrossômica) (de Lamirande e O'Flaherty, 2008). O $O_2^{\bullet-}$, que é um oxidante impermeável às células, reage com uma variedade de proteínas; o H_2O_2 é um oxidante muito mais poderoso, permeável às células e que reage com a maioria das moléculas celulares; e o NO que é um mediador de sinalização com diversas atividades biológicas. Em espermatozoides, diferentes vias celulares são ativadas por ação do NO e participam de eventos fisiológicos e patofisiológicos (Ignaro, 2000), embora não conheçamos todos os mecanismos de sua ação.

Em nossos estudos, identificamos um aumento na produção de NO pela L-arg, que está relacionado a uma melhora na motilidade progressiva e vigor de espermatozoides bovinos *in natura* após 4 horas de incubação em meio capacitante contendo L-arg (Leal *et al.*, 2009), além da melhora na integridade da membrana plasmática, atividade mitocondrial, capacitação espermática avaliada pelo percentual de oócitos homólogos penetrados. Posteriormente, Leal *et al.* (2012) avaliaram a via L-arg/NO/GMPc utilizando espermatozoides criopreservados e verificaram que a L-arg também atua na diminuição da peroxidação lipídica e aumento da atividade mitocondrial. Estes resultados estão representados na fig. 1.

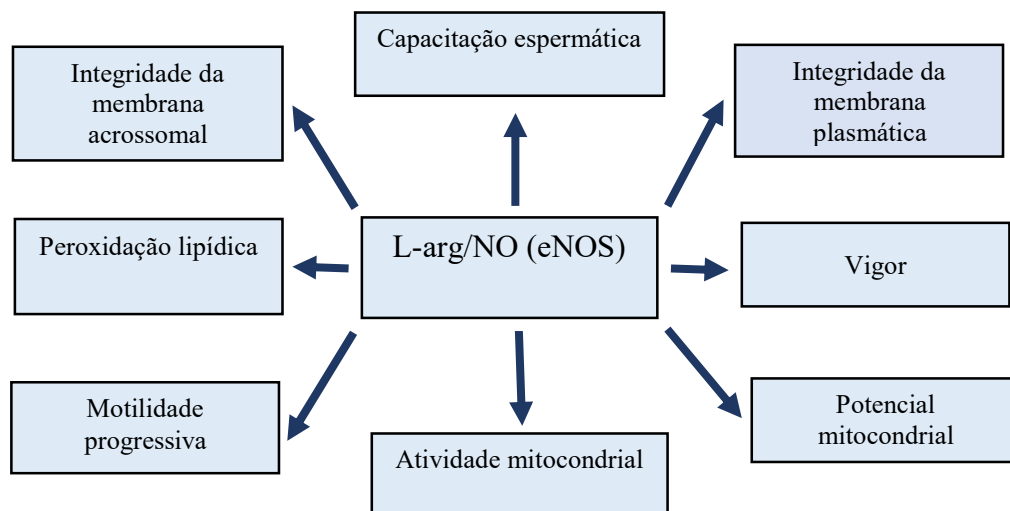


Figura 1: Ação da via L-arg/NO derivado da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) na capacitação espermática *in vitro* em bovinos (Leal *et al.* 2009, 2012).

A L-arg levou a uma alteração no perfil de proteínas (Maciel Jr. *et al.*, 2018) no de espermatozoides tratados com L-arg durante a capacitação. Houve um aumento da expressão de

proteínas importantes à fertilidade, uma vez que já foram descritas por participar da geração de energia (NADP e NDK), ligação/penetração dos espermatozoides com os oócitos (ADAMs) e desenvolvimento embrionário (GLI3). Ainda nesse estudo, foi demonstrada a expressão exclusiva da AKAP3 no grupo tratado. Essas alterações encontradas durante a capacitação espermática podem ter ocorrido em decorrência da síntese ou degradação de proteínas (Gspomer *et al.*, 2008), modificações pós-traducionais como a fosforilação (Gangwar e Atreja, 2015) e a S-nitrosilação (Lefièvre *et al.*, 2007), ou alterações na estrutura secundária ou terciária e translocação extracelular. Finalmente, essas mudanças proteômicas podem ter relação com a melhora na qualidade espermática, uma vez que demonstramos que espermatozoides tratados com a L-arg tiveram maior motilidade, aumento no potencial mitocondrial e melhora na capacitação e integridade da membrana plasmática (Maciel Jr. *et al.*, 2018).

Na direção de identificar os mecanismos de sinalização celular pelos quais a L-arg leva à melhora na motilidade e capacitação dos espermatozoides, foi demonstrada sua participação na via GMPc/PKG1 (Maciel Jr. *et al.*, 2018). Além disso, nesse estudo ficou demonstrado que os mecanismos de ação da L-arg durante a capacitação espermática de bovinos podem ocorrer ou não pela via NO/GMPc (fig. 2).

Como veremos a seguir, essa melhoria dos espermatozoides que foi demonstrada com o uso da L-arg durante a capacitação espermática em bovinos, tem um reflexo positivo na produção de embriões *in vitro* (Aguiar *et al.*, 2019).

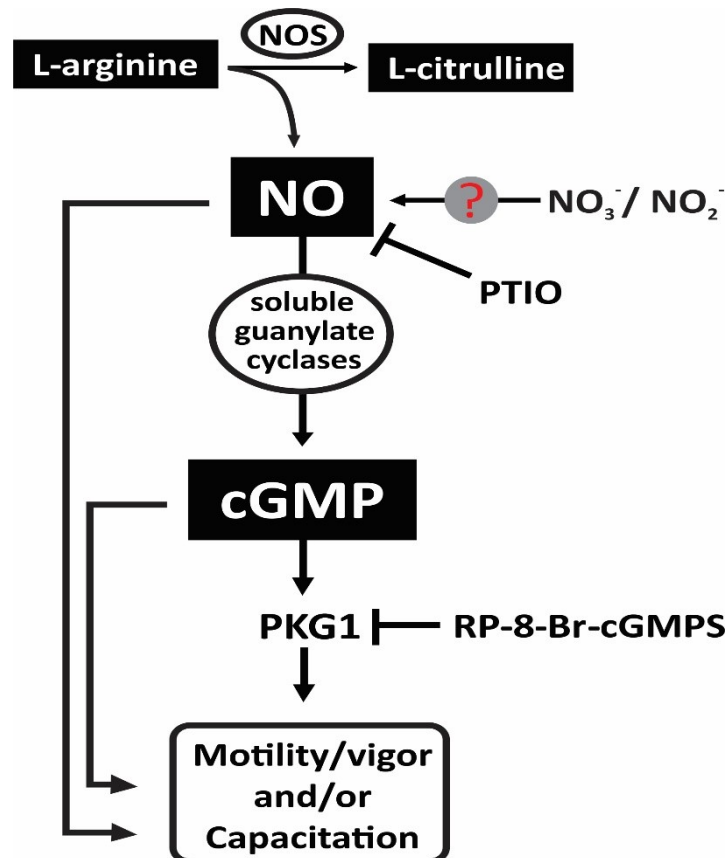


Figura 2: Representação esquemática da via de sinalização L-arg/NO/GMPc em espermatozoides bovinos durante a capacitação *in vitro*. Os compostos usados neste estudo são nomeados ao lado de seus alvos. O PTIO é um *scavenger* de NO, e o Rp-8-Br-cGMPS é um inibidor seletivo do sítio de ligação para GMPc em PKG1 (Maciel Jr. *et al.*, 2019).

Complexo *cumulus* oócito

Dubeibe *et al.* (2017) avaliaram o efeito da suplementação do meio de cultivo com diferentes concentrações de L-arg (2.5, 5.0, and 10.0 mM) na maturação nuclear, concentração de nitrato/nitrito, 17 β -estradiol (E₂) e progesterone (P₄) no meio de cultivo, e de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) e



adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular nos COCs durante as primeiras horas de maturação em presença de hemi-seções da parede folicular. Os resultados mostram que usando este sistema de cultivo que visou se aproximar das condições de maturação *in vivo*, que (1) o mecanismo que dá ao oócito a habilidade de reiniciar a meiose até MI após a adição de 5.0-mM de L-arg não envolve mudanças na concentração de nitrato/nitrito, P₄, e E₂ no meio de cultivo e (2) a L-arg atua na via que envolve mudanças na concentração de GMPc, mas não envolve mudanças na concentração de AMPc. Mais estudos são necessários para assegurar se os efeitos observados da L-arg durante a MIV usando este sistema de cultivo é via NO ou não, e qual o papel do aumento da viabilidade das células do *cumulus* na retomada e progressão da meiose até MI.

Num estudo realizado para avaliar o papel do metabolismo de aminoácidos no desenvolvimento da competência de oócitos bovinos, Kowsar *et al.* (2020) verificaram que a arginina teve o maior poder preditivo para se identificar COCs competentes no sistema de maturação *in vitro*. Mais estudos são necessários para se avaliar o papel da L-arg e seu metabolismo durante a maturação de oócitos bovinos utilizando o sistema usual de cultivo com o objetivo de otimizar a produção *in vitro* de embriões bovinos.

Impacto na produção *in vitro* de embriões

Capacitação espermática

Embora a L-arg já tenha sido usada na capacitação espermática (Funahashi, 2002; O'Flaherty *et al.*, 2004; Leal *et al.*, 2009), a maioria dos estudos não tinham avaliado seu efeito após a capacitação, como na produção *in vitro* de embriões. Santana *et al.* (2016) verificaram que a adição de concentrações mais elevadas de L-arg (10 mM) ao meio FIVE sem heparina, apresentaram o mesmo efeito capacitante que a heparina, assim como nas concentrações de NO₃⁻/NO₂⁻, sugerindo que ambos os tratamentos possam estar atuando na mesma via de sinalização.

Nossos achados indicaram que a adição de L-arg ao meio capacitante contendo heparina aumentou o número de espermatozoides capacitados e diminuiu o número de espermatozoides não capacitados e com acrossomo-reagido com 30 min de cultivo em ausência de COCs. Além disso, a pré-capacitação não causou nenhuma interferência na porcentagem de espermatozoides com membrana intacta. Visto que o método de pré-capacitação induzida pela heparina com a adição de L-arg ao meio de cultivo e em ausência de COCs foi o método mais efetivo para a produção de blastocistos *in vitro* em bovinos, nós enfatizamos que ele pode ser usado para assegurar o papel de outras substâncias na capacitação espermática e seus efeitos na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Diferenciação embrionária pré-implantação

Santana *et al.* (2014) verificaram que a suplementação do meio de cultivo (D5-D8) com 1 mM de L-arg em presença de heparina, aumentou a cinética de desenvolvimento (maior porcentagem de embriões eclodidos no D8) e qualidade embrionária (maior expressão do gene POU5F1 em embriões eclodidos). Este gene é um marcador de pluripotência em blastocistos de bovinos (Niemann e Wrenzycki, 2000; Yao *et al.*, 2009). Sua abundância foi correlacionada com o aumento da produção de NO na segunda metade do cultivo.

Mais estudos são necessários para entender os mecanismos de ação da L-arg no metabolismo dos COCs e espermatozoides, e na diferenciação embrionária pré-implantação.

Considerações finais

Diante do exposto e baseado nos estudos prévios do nosso grupo e de outros, é possível estabelecer algumas informações importantes acerca do uso da L-arg na produção *in vitro* de embriões bovinos. Ou seja, pudemos verificar que a pré-capacitação induzida pela heparina + L-arg por 30 min foi o sistema que apresentou maior eficiência na produção de blastocistos. Apesar disso, outras substâncias com potencial para aumentar a qualidade e percentual de espermatozoides capacitados devem ser testadas e adicionadas ao meio de capacitação.

Observamos que a capacitação espermática, embora seja um evento disparado por diversas vias de sinalização, possui uma resposta mais rápida aos tratamentos *in vitro* e portanto, mais fácil de se avaliar, em relação à maturação *in vitro* dos COCs. Além disso, a pré-capacitação, permite avaliar o uso de substâncias diferentes agindo apenas nos espermatozoides, de maneira mais controlada em relação ao



processo de fertilização, onde ambos gametas poderiam sofrer ação do tratamento. Dessa maneira, poderíamos explorar de maneira mais assertiva o tratamento e estabelecer concentrações ideais do que está sendo testado, aumentando o potencial fértil dos espermatozoides, uma vez que estes contribuem com 50% dos resultados da PIVE.

Finalmente, estudos devem ser realizados para investigar os próximos passos da produção *in vitro* utilizando o sistema de pré-capacitação com a L-arg, ou seja, verificar taxas gestacionais e de nascimento de bezerros como consequência desse tratamento, para que possamos garantir ou não um incremento a nível comercial.

Referências

- Aguiar GB, Caldas-Bussiere MC, Maciel Jr VL, Paes de Carvalho CS, Souza CLM.** Association of L-arginine with heparin on the sperm capacitation improves *in vitro* embryo production in bovine. *Animal Reproduction*, v.16, 9.938-944, 2019.
- Aquila S, Giordano F, Guido C, Rago V, Carpino A.** Nitric oxide involvement in the acrosome reaction triggered by leptin in pig sperm. *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.9, p.133, 2011.
- Aurich J, Köhne M, Wulf M, Nagel C, Beythien E, Gautier C, Zentek J, Aurich C.** Effects of dietary L-arginine supplementation to early pregnant mares on conceptus diameter—Preliminary findings. *Reproduction in Domestic Animals*, v.54, p.772-778, 2019.
- Barbul A.** Arginine: biochemistry, physiology and therapeutic implications. *Parenter. Enteral nutrition*, v.10, p.227-238, 1986.
- Buzadzic C, Vucetic M, Jankovic A, Stancic A, Korac A, Korac B, Otasevic Buzadzic V.** New insights into male (in) fertility: the importance of NO. *British Journal of Pharmacology*, v.172, p.1455-1467, 2015.
- Chavez JAR, Guzmán A, Zamora-Gutiérrez D, Mendoza GD, Melgoza LM, Montes S, Rosales-Torres AM.** Supplementation with rumen-protected L-arginine-HCl increased fertility in sheep with synchronized estrus. *Tropical Animal Health and Production*, v. 47, p. 1067–1073, 2015.
- Che D, Adams S, Zhao B, Qin G, Jiang H.** Effects of dietary L-arginine supplementation from conception to post-weaning in piglets. *Current Protein and Peptide Science*, v. 7, p. 736-749, 2019.
- De Lamirande E, Gagnon C.** Reactive oxygen species (ROS) and reproduction. *Adv Exp Med*, v.366, p.185-197, 1994.
- De Lamirande E, O'Flaherty C.** Sperm activation: Role of reactive oxygen species and kinases. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, v.1784, p.106–115, 2008.
- Dubeibe DF, Caldas-Bussiere MC, Maciel VL Jr, Sampaio WV, Quirino CR, Gonçalves PBD, De Cesaro MP, Faes MR, Paes de Carvalho CS.** L-Arginine affects the IVM of cattle *cumulus*-oocyte complexes. *Theriogenology*, v.88, p.134-144, 2017.
- Funahashi H.** Induction of capacitation and the acrosome reaction of boar spermatozoa by L-arginine and nitric oxide synthesis associated with the anion transport system. *Reproduction*, v.124(6), p.857-864, 2002.
- Gangwar, DK, Atreja SK.** Signalling events and associated pathways related to the mammalian sperm capacitation. *Reprod Domest Anim*, v. 50, p. 705–711, 2015.
- Gao K, Jiang Z, Lin Y, Zheng C, Zhou G, Chen F, Yang L, Wu G.** Dietary L-arginine supplementation enhances placental growth and reproductive performance in sows. *Amino Acids*, v. 42, n.6, p.2207–2214, 2012.
- Gisponer J, Futschik ME, Teichmann SA, Babu MM.** Tight Regulation of unstructured proteins: From transcript synthesis to protein degradation. *Science*, v.322, p.1365–1368, 2008.
- Herrero MB, Viggiano JM, Perez Martinez S, De Gimeno MF.** Effects of nitric oxide synthase inhibitors on the outcome of *in vitro* fertilization in the mouse. *Reproduction and Fertility Development*, v.8, p.301–304, 1996.
- Ignaro LJ.** Nitric oxide. Biology and Pathobiology. Academic Press, San Diego, 2000, 1003 p.
- Jenkinson CP, Grody WW, Cederbaum SD.** Comparative properties of arginases. *Comp. Biochem. Physiol.* v.114, p.107-132, 1996.
- Kowsar R, Mansouri A, Sadeghi N, Abadi MHA, Ghoreishi SM, Sadeghi K, Miyamoto A.** A multilevel analysis identifies the different relationships between amino acids and the competence of oocytes matured individually or in groups. *Scientific Reprints*, 10:16082, 2020.
- Leal ACMS, Caldas-Bussiere MC, Carvalho CSP, Viana KS, Quirino CR.** Role of nitric oxide on quality of freshly ejaculated bull spermatozoa during heparin-induced *in vitro* capacitation. *Anim Reprod*



Sci, v. 116(1-2), p. 38- 49, 2009.

Leal ACMS, Caldas-Bussiere MC, Ohashi OM, Cordeiro MS, Quirino C. Assessment of bovine sperm capacitation pathway L-arginine/NO/GMPc through *in vitro* embryo production. In: Proceedings of the 17th International Congress on Animal Reproduction (ICAR). *Reprod Domest Anim*, v.47, p.586, 2012.

Lefièvre L, Chen Y, Conner SJ, Scott JL, Publicover SJ, Ford WCL. Human spermatozoa contain multiple targets for protein S-nitrosylation: An alternative mechanism of the modulation of sperm function by nitric oxide? *Proteomics*, v.7, p.3066–3084, 2007.

Li X, Bazer FW, Johnson GA, Burghardt RC, Frank JW, Dai Z, Wang J, Wu Z, Shinzato I, Wu G. Dietary supplementation with L-arginine between days 14 and 25 of gestation enhances embryonic development and survival in gilts. *Amino Acids*, v.46, n.2, p.375-384, 2014.

Maciel VL Jr, Caldas-Bussiere MC, Silveira V, Reis RS, Rios AFL, Paes de Carvalho CS. L-Arginine alters the proteome of frozen-thawed bovine sperm during *in vitro* capacitation. *Theriogenology*, v.119, p.1-9, 2018.

Maciel VL, Caldas-Bussiere MC, Dubeibe Marin DF, Paes de Carvalho CS, Quirino CR, Leal ACMS. Nitric oxide impacts bovine sperm capacitation in a cGMP-dependent and independent manner. *Reprod Domest Anim*, v.00, p.1-9, 2019.

Mateo RD, Wu G, Bazer FW, Park JC, Shinzato I, Kim SW. Dietary L-Arginine supplementation enhances the reproductive performance of gilts. *The Journal of Nutrition*, v.137, p.652–656, 2007.

Matta SGC, Caldas-Bussiere MC, Viana KS, Faes MR, Paes De Carvalho CS, Dias BL, Quirino CR. Effect of inhibition of synthesis of inducible nitric oxide synthase derived nitric oxide by aminoguanidine on the *in vitro* maturation of oocyte cumulus complexes of cattle. *Animal Reproduction Science*, v.111 p.189–201, 2009.

Niemann H, Wrenzycki C. Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology*, v.53, p.21-34, 2000.

O’Flaherty C, Rodriguez P, Srivastava S. L-Arginine promotes capacitation and acrosome reaction in cryopreserved bovine spermatozoa. *Biochim Biophys Acta*, v.1674(2), p.215-21, 2004.

Pires PR, Santos NP, Adona PR, Natori MM, Schwarz KR, De Bem TH, Leal CVL. Endothelial and inducible nitric oxide synthases in oocytes of cattle. *Animal Reproduction Science*, v.119, p.233-243, 2009.

Rodriguez PC, O’Flaherty CM, Beconi MT, Beorlegui NB. Nitric oxide-induced capacitation of cryopreserved bull spermatozoa and assessment of participating regulatory pathways. *Animal Reproduction Science*, v.85, p.231-242, 2005.

Rodrigues-Krause J, Krause M, Rocha IMGD, Umpierre D, Fayh APT. Association of L-arginine supplementation with markers of endothelial function in patients with cardiovascular or metabolic disorders: a systematic review and meta-analysis. *Nutrients*, v.11, n.1, p.15, 2018.

Santana PPB, Silva TVG, Costa NG, Silva BB, Carter TF, Cordeiro MS, Silva BJM, Santos SSD, Herculano AM, Adona PR, Ohashi OM, Miranda MS. Supplementation of bovine embryo culture medium with L-arginine improves embryo quality via nitric oxide production. *Mol Reprod Dev*, v.81, p. 918–927, 2014.

Santana PPB, Silva BB, Silva TVG, Costa NN, Cordeiro MS, Santos SSD, Ohashi OM, Miranda MS. Addition of L-arginine to the fertilization medium enhances subsequent bovine embryo development rates. *Theriogenology*, v.85(6), p.1132-8, 2016.

Tesfaye D, Kadanga AF, Rings F, Bauch K, Jennen D, Nganvongpanit K, Hölker M, Tholen E, Ponsuksili S, Wimmers K, Montag M, Gilles M, Kirfel G, Herzog V, Schellander K. The effect of nitric oxide inhibition and temporal expression patterns of their RNA and protein products of nitric oxide synthase genes during *in vitro* development of bovine pre-implantation embryos. *Reproduction of Domestic Animals*, v.41, p.501–509, 2006.

Viana KS, Caldas-Bussiere MC, Carvalho CSP, Dias BL, Lanes VR, Quirino CR. Efeito de diferentes formas de cultivo na ação do óxido nítrico na maturação e na integridade da membrana plasmática de complexos cumulus-oócito em bovinos. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v. 48, n. 2, p. 147-154, 2011.

Viana KS, Caldas-Bussiere MC, Matta SGC, Faes MR, Paes De Carvalho CS, Quirino CR. Effect of sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, on the *in vitro* maturation of bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*, v. 102, n.3-4, p.217-227, 2007.

Wang J, Qingliu H, Xingyu Y, Youmei C, Junyi C. Effect of exogenous nitric oxide on sperm motility



in vitro. *Biological Research*, v.47, p.2–8, 2014.

Weckman AM, McDonald CR, Baxter JB, Fawzi WW, Conroy AL, Kain, KC. Perspective: L-arginine and L-citrulline supplementation in pregnancy: a potential strategy to improve birth outcomes in low-resource settings. *Advances in Nutrition*, v.10, p.765–777.

Wu G, Bazer FW, Satterfield, MC, Li X, Wang X, Johnson GA, Burghardt RC, Dai Z, Wang J, Wu Z. Impacts of arginine nutrition on embryonic and fetal development in mammals. *Amino Acids*, v. 45, p. 241–256, 2013.

Wu G, Morris SM. Arginine metabolism: Nitric oxide and beyond. *Biochem J*, v. 336, p.1-17, 1998.

Yao N, Wan PC, Hao ZD, Gao FF, Yang L, Cui MS, Wu Y, Liu JH, Liu S, Chen H, Zeng SM. Expression of interferon-tau mRNA in bovine embryos derived from different procedures. *Reprod Domest Anim*, v.44, p.132-139, 2009.

Zeng X, Wang F, Fan X, Yang W, Zou B, Li P, Ying Y, Wu G, Wang J. Dietary arginine supplementation during early pregnancy enhances embryonic survival in rats. *The Journal of Nutrition*, v.138, p.1421–1425, 2008.
