

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

**UTILIZAÇÃO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS UNILAMELARES
COMO CARREADORAS DE ANTIOXIDANTES EM
SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Luana Teixeira Rodrigues Rossi

Médica Veterinária

2019

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

**UTILIZAÇÃO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS UNILAMELARES
COMO CARREADORAS DE ANTIOXIDANTES EM
SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

Luana Teixeira Rodrigues Rossi

Orientadora: Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

Coorientador: Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki

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

R696u

Rodrigues-Rossi, Luana Teixeira

Utilização de vesículas lipídicas unilamelares como carreadoras de antioxidantes em sistemas de cultivo in vitro de embriões bovinos / Luana Teixeira Rodrigues-Rossi. -- Jaboticabal, 2019

53 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Gisele Zoccal Mingoti

Coorientador: Marcelo Fábio Gouveia Nogueira

1. Desenvolvimento embrionário. 2. Antioxidante. 3. Embriotoxicidade. 4. Espécies reativas do oxigênio. 5. Vesículas unilamelares gigantes. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: UTILIZAÇÃO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS UNILAMELARES COMO CARREADORAS DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

AUTORA: LUANA TEIXEIRA RODRIGUES ROSSI

ORIENTADORA: GISELE ZOCCAL MINGOTI

COORDENADOR: MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA

COORDENADOR: PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área Reprodução Animal pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISELE ZOCCAL MINGOTI

Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / FMV/UNESP - Araçatuba

Profa. Dra. BEATRIZ CAETANO DA SILVA LEÃO (Skype)

Instituto de Ensino Superior de Rio Verde - IESRIVER / Rio Verde/GO

Profa. Dra. MARION BURKHARDT DE KOIVISTO

Departamento de Clínica, Cirurgia e Reprodução Animal / FMV/UNESP - Araçatuba

Jaboticabal, 12 de julho de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Luana Teixeira Rodrigues – nascida em Araçatuba-SP, aos 17 dias do mês de Fevereiro de 1993, filha de Célia Regina Teixeira e Enio Matias Rodrigues Junior. Concluiu o ensino médio no Unicolégio Objetivo, na cidade de Araçatuba-SP, em dezembro de 2010. Ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária, no Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium – UniSALESIANO, Câmpus de Araçatuba-SP, em Fevereiro de 2012. Concluiu o ensino superior em Medicina Veterinária em dezembro de 2016. Durante a graduação foi aluna de iniciação científica e bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq primeiramente pela Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA) - Extremo Oeste sob a orientação do Dr. Daniel Cardoso (2013-2014) e posteriormente pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Araçatuba sob a orientação da Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti (2015-2016). Realizou treinamento técnico pelo Programa de Graduação de Biologia Celular e Molecular Animal no Departamento de Ciência Animal na Universidade da Flórida, Gainesville - EUA sob a orientação do Prof. Peter J. Hansen (Julho a Setembro de 2016). Ingressou no curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, nível de Mestrado e área de concentração de Reprodução Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Campus de Jaboticabal-SP, em março de 2017, sob orientação da Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, com bolsa de mestrado da CAPES.

EPÍGRAFE

“Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, se arraste, mas nunca pare de avançar.”

Martin Luther King Jr.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todos veem.”

Arthur Schopenhauer

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais Célia e Claudinei por toda dedicação e cuidado. Aos meus irmãos Nathália e Gabriel que mostraram que nunca estarei sozinha. Ao meu marido Lucas, que pacientemente, esteve ao meu lado me apoiando e incentivando.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que esteve sempre diante de mim, sustentando, capacitando e renovando minhas forças.

Aos meus queridos pais Célia e Claudinei por toda dedicação e cuidado, que sempre lutaram sem medir esforços em me proporcionar o melhor. Serei eternamente grata a vocês.

À Profa. Dra. Gisele Zoccal Mingoti, pelo carinho, orientação, ensinamentos, motivação e principalmente pela confiança em mim estabelecida para executar este trabalho inovador.

Ao Prof. Dr. Pedro Henrique Benites Aoki por gentilmente abrir as portas do Laboratório de Nanobiotecnologia, pela orientação e disposição para que o trabalho pudesse ser realizado.

Ao Prof. Dr. Marcelo Fábio Gouveia Nogueira, por gentilmente abrir as portas do Laboratório de Micromanipulação Embrionária disponibilizando-o sempre que precisei.

Às amigas do Laboratório de Fisiologia da Reprodução Giovana Barros Nunes, Cintia Rodrigues Da Silva, Nathália A. S. Rocha-Frigoni, Beatriz C. S. Leão e Priscila Chediek Dall' Acqua, pelos ensinamentos, apoio e ajuda.

Aos amigos do Laboratório de Micromanipulação Embrionária Priscila Helena Santos, Hugo De Rossi, Vitória Guilherme, Sara Nunes pela confiança e ajuda na execução do trabalho.

À Sabrina e Maria Julia do Laboratório de Nanobiotecnologia pelo treinamento e ajuda na execução da técnica de eletroformação.

Ao técnico do laboratório, Alexandre Teixeira, pelo auxílio necessário para a realização do experimento e funcionamento do laboratório.

Ao funcionário Adão Custódio por providenciar o material necessário para a realização do experimento.

À minha Irmã Nathália T. Rodrigues que me apoiou em todos os momentos e sempre se preocupou comigo.

Ao meu esposo Lucas Rossi, que pacientemente, esteve ao meu lado me incentivando e compreendendo minha ausência em diversos momentos, para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Às minhas amigas Maria Isabela Azeredo e Vanessa Faria que em todos os momentos me apoiaram, vibraram com minhas conquistas e me acolheram com carinho e oração.

Às amigas que ganhei no mestrado Patrícia Heggendorn (e sua filha Frida Heggendorn) e Isabela Pazzoto que me acompanharam desde o início e sempre me motivaram e seguir.

Às minhas amigas Isabela Cury, Nathaly Soares, Juliana Viegas e Tâmilis Cornachini Corandini que sempre me apoiaram independente da distância.

À minha Família e a Família Rossi, que sempre me incentivaram e ajudaram durante os momentos difíceis sempre se preocupando com meu bem estar.

À CAPES pela bolsa de estudos.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal pela oportunidade de realizar o mestrado

À Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista e ao Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal pelas instalações oferecidas para a realização do experimento.

APOIO FINANCEIRO

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. OBJETIVOS GERAIS	3
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3. HIPÓTESE	3
4. REVISÃO DE LITERATURA	3
4.1. PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	3
4.2. ESTRESSE OXIDATIVO	6
4.3. ANTIOXIDANTES	8
4.4. VESÍCULAS LIPÍDICAS UNILAMELARES	10
5. MATERIAL E MÉTODOS	12
5.1. REAGENTES QUÍMICOS E MEIOS	12
5.2. ELETROFORMAÇÃO E FORMA DE AVALIAÇÃO DAS VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES (GUVs).....	13
5.3. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	14
5.3.1 EXPERIMENTO I: EFEITO DA MENADIONA SOBRE A INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM GUVs CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	14
5.3.2 EXPERIMENTO II: EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM GUVs CULTIVADAS <i>IN VITRO</i>	15
5.3.3 EXPERIMENTO III: INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO PELA MENADIONA EM EMBRIÕES CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> NA PRESENÇA DE GUVs	15

5.3.4 EXPERIMENTO IV: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE GUVs COMO CARREADORAS DE CISTEÍNA NO MEIO DE CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS	16
5.4 SELEÇÃO E MATURAÇÃO DE OÓCITOS	18
5.5 FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> E CULTIVO DE EMBRIÕES	18
5.6 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INTRACITOPLASMÁTICAS DE ROS	19
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	20
6. RESULTADOS	20
6.1 EXPERIMENTO I	20
6.2 EXPERIMENTO II	21
6.3 EXPERIMENTO III	22
6.4 EXPERIMENTO IV	24
7. DISCUSSÃO	26
8. CONCLUSÕES	31
9. REFERÊNCIAS	31

CERTIFICADO COMITÊ DE ÉTICA



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



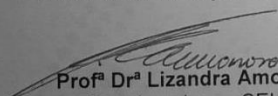
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Utilização de vesículas lipídicas unilamelares como possíveis marcadoras de condições de estresse oxidativo em sistemas de cultivo *in vitro* de embriões bovino**", protocolo nº 009981/17, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Gisele Zoccal Mingotti, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 06 de Julho de 2017.

Vigência do Projeto	01/08/2017 a 20/12/2018
Espécie / Linhagem	Ovários bovinos de animais de abatedouros
Nº de animais	Não se aplica
Peso / Idade	Não se aplica
Sexo	Fêmeas
Origem	Abatedouro

Jaboticabal, 06 de julho de 2017.


Profª Drª Lizandra Amoroso
Coordenadora – CEUA

UTILIZAÇÃO DE VESÍCULAS LIPÍDICAS UNILAMELARES COMO CARREADORAS DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS DE CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

RESUMO- As vesículas lipídicas unilamelares gigantes (GUVs) são consideradas ótimas ferramentas em sistemas de estudos que mimetizam membranas biológicas, devido à sua composição fosfolipídica e sensibilidade ao estresse oxidativo, além de possuírem capacidade de encapsular macromoléculas. Este foi o primeiro estudo a utilizar vesículas unilamelares gigantes como carreadoras de antioxidante (cisteína) em sistema de produção *in vitro* de embriões (PIVE). Sua utilização aliada ao sistema de cultivo é interessante, pois acredita-se poder ocorrer liberação do antioxidante de acordo com a demanda do sistema de PIVE. O objetivo desse estudo foi avaliar o comportamento das GUVs co-cultivadas *in vitro* com embriões bovinos, definir o método de indução ao estresse oxidativo e sua efetividade ao encapsular e carrear antioxidantes sob condições de estresse oxidativo. Foram testados indutores de estresse oxidativo [menadiona (MD) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)] nas GUVs, sendo o H_2O_2 em altas concentrações eficaz em induzir o estresse oxidativo através da alteração do diâmetro [Controle (18,96 μm) vs. H_2O_2 0,1 mM (17,71 μm), H_2O_2 0,5 mM (17,32 μm) e H_2O_2 1,0 mM (16,63 μm)]. Houve redução na taxa de desenvolvimento embrionário ($P < 0,05$) dos grupos co-cultivados com GUVs e submetidos ao estresse oxidativo pela MD [Controle (26,70%) GUV (25,18%) vs. GUV+MD 5,0 μM (6,95%) e GUV+MD 7,5 μM (0,95%)]. As maiores concentrações intracelulares de ROS em embriões bovinos ($P < 0,05$), foi no grupo GUV+MD 5,0 μM (16,28) vs. Controle (3,76) e GUV (3,99 $\pm$ 0,33). Ao co-cultivar GUVs, com cisteína encapsulada em seu interior, com embriões bovinos e submetê-los ao estresse oxidativo, pôde ser observado que a taxa de desenvolvimento embrionário foi menor ($P < 0,05$) nos grupos (MD: 9,46%; MD + Cist: 1,19%; e GUV(Cist 3mM) + MD: 1,15%) e nos grupos cultivados com maior concentração de cisteína [GUV(Cist 129mM): 0,0% e GUV(Cist 129mM) + MD: 0,0%] em comparação aos demais grupos (controle: 25,58%; Cist: 31,77%; e GUV(Cist 3mM): 30,16. A taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto foi menor ($P < 0,05$) nos grupos submetidos ao estresse oxidativo pela menadiona (MD: 9,46%; MD + Cist: 1,19%; e GUV(Cist 3mM) + MD: 1,15%) e nos grupos cultivados com maior concentração de cisteína [GUV(Cist 129mM): 0,0% e GUV(Cist 129mM) + MD: 0,0%] em comparação aos demais grupos (controle: 25,58%; Cist: 31,77%; e GUV(Cist 3mM): 30,16. O grupo GUV(Cist 3mM) exibiu menores ($P < 0,05$) concentrações de ROS (0,09 UAF) comparado ao grupo Cist (0,16 UAF), mas ambos não diferiram do grupo controle (0,10 UAF), sendo as maiores concentrações de ROS observadas no grupo MD (0,34 UAF). Em conclusão as GUVs não promoveram efeito tóxico e nem aumentaram as concentrações intracelulares de ROS nos embriões. As GUVs produzidas com cisteína em seu interior apresentaram-se mais eficientes para prevenir o aumento de ROS.

Palavras-Chave: Desenvolvimento embrionário, antioxidante, embriotoxicidade, espécies reativas do oxigênio, vesículas unilamelares gigantes

UTILIZATION OF UNILAMILAR LIPID VESICLES AS ANTIOXIDANT CARRIERS IN *IN VITRO* CULTURE SYSTEMS OF BOVINE EMBRYOS

ABSTRACT- Giant unilamellar lipid vesicles (GUVs) are considered to be great tools in study systems that mimic biological membranes due to their phospholipid composition and sensitivity to oxidative stress, as well as their ability to encapsulate macromolecules. This was the first study to use giant unilamellar vesicles as antioxidant (cysteine) carriers in an *in vitro* embryo production system (PIVE). Its use combined with the cultivation system would be interesting because it is believed that antioxidant release could occur according to the demand of the PIVE system. The aim of this study was to evaluate the behavior of GUVs co-cultured *in vitro* with bovine embryos, to standardize the oxidative stress induction method and its effectiveness to encapsulate and carry antioxidants under oxidative stress conditions. Oxidative stress inducers [menadione (MD) and hydrogen peroxide (H₂O₂)] were tested in GUVs, and H₂O₂ at high concentrations was effective in inducing oxidative stress by changing the diameter [Control (18.96 μ m) vs. 0.1 mM H₂O₂ (17.71 μ m), 0.5 mM H₂O₂ (17.32 μ m) and 1.0 mM H₂O₂ (16.63 μ m)]. Embryonic development rate ($P < 0.05$) was reduced in groups co-cultivated with GUVs and submitted to oxidative stress by DM [Control (26.70%) GUV (25.18%) vs. GUV + MD 5.0 μ M (6.95%) and GUV + MD 7.5 μ M (0.95%)]. The highest intracellular ROS concentrations in bovine embryos ($P < 0.05$) were in the GUV + MD 5.0 μ M group (16.28) vs. Control (3.76) and GUV (3.99 $\pm$ 0.33). By co-cultivating GUVs with encapsulated cysteine inside, with bovine embryos and subjecting them to oxidative stress, it could be observed that the embryonic development rate was lower ($P < 0.05$) in the groups (MD: 9.46 % MD + Cist: 1.19%, and GUV (3mM Cist) + MD: 1.15%) and in the cultivated groups with the highest cysteine concentration [GUV (Cist 129mM): 0.0% and GUV (Cist 129mM) + MD: 0.0%] compared to the other groups (control: 25.58%; Cist: 31.77%; and GUV (Cist 3mM): 30.16. The embryonic development rate to the blastocyst stage was lower ($P < 0.05$) in the groups subjected to oxidative stress by menadione (MD: 9.46%; MD + Cist: 1.19%; and GUV (Cist 3mM) + MD: 1.15%) and in cultivated groups with higher cysteine concentration [GUV (Cist 129mM): 0.0% and GUV (Cist 129mM) + MD: 0.0%] compared to the other groups (control: 25.58%; Cist: 31.77 % and GUV (Cist 3mM): 30.16. The GUV group (Cist 3mM) exhibited lower ($P < 0.05$) ROS concentrations (0.09 UAF) compared to the Cist group (0, 16 UAF), but both did not differ from the control group (0.10 UAF), with the highest ROS concentrations observed in the MD group (0.34 UAF). In conclusion, GUVs did not promote toxic effects, nor did they increase intracellular ROS concentrations in embryos. GUVs produced with cysteine inside were more efficient to prevent the increase of ROS.

Keywords: Embryonic development, antioxidant, embryotoxicity, reactive oxygen species, giant unilamellar vesicles.

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos cresceu significativamente nas últimas décadas. Essa biotecnologia tornou-se uma importante ferramenta para a aceleração do melhoramento genético de rebanhos e tem sido aplicada em larga escala comercial (WU; ZAN, 2012; KUSSANO et al., 2016).

O sucesso da PIVE está diretamente ligado tanto a fatores intrínsecos, como a qualidade e competência dos oócitos (RIZOS et al., 2002), como também a fatores extrínsecos, decorrentes da excessiva manipulação e exposição dos gametas e embriões às condições adversas do ambiente de cultivo. As altas concentrações de oxigênio e prolongada incidência de luz nestas estruturas manipuladas e cultivadas *in vitro* levam à produção de espécies reativas do oxigênio (do inglês “reactive oxygen species” - ROS), que podem ocasionar redução do desenvolvimento e da qualidade dos embriões produzidos (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; WANG et al., 2014).

As ROS são metabólitos provenientes da fosforilação oxidativa na cadeia respiratória mitocondrial e o equilíbrio entre a produção e a eliminação destes radicais livres mantém a homeostase dos processos de redução e oxidação (redox) celular (ZHAO et al., 2017). Em baixas concentrações, as ROS participam de vários processos fisiológicos de sinalização celular (BASINI et al., 2008; DOWLING; SIMMONS, 2008), no entanto, quando há desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos antioxidantes, a condição de estresse oxidativo é estabelecida. A produção excessiva de ROS culmina em peroxidação lipídica, lesão no DNA celular (FEUGANG et al., 2003; TAMURA et al., 2012) e perda da integridade da membrana decorrente do processo de oxidação que promove modificações estruturais e aumento na permeabilidade passiva da bicamada lipídica (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; TAMURA et al., 2012). Esta situação é extremamente prejudicial aos gametas ou embriões e, por isso, a inclusão de antioxidantes aos meios de cultivo tem sido utilizada com a finalidade de reduzir os efeitos deletérios causados pelas ROS, visando aumentar a capacidade antioxidante dos gametas e embriões produzidos *in vitro* (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003; ROCHA-FRIGONI et al., 2014).

Compostos tiol de baixo peso molecular, como por exemplo a cisteína, tem sido utilizados para suplementar o meio de maturação do oócito e de cultivo do embrião (TAKAHASHI et al., 1993; DE MATOS; FURNUS; MOSES, 1997; ROCHA-FRIGONI et al., 2013; ROCHA-FRIGONI et al., 2014), onde servem como precursores para a produção intracelular da glutathione (GSH) necessária para a desintoxicação de peróxidos lipídicos e proteínas tioladas, além de estar envolvida na remoção das ROS, especialmente do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (JOHNSON; NASR-ESFAHANI, 1994). A biossíntese de GSH depende da presença de cisteína no meio (RATHBUN; MURRAY, 1991), todavia, a cisteína é instável fora da célula e é rapidamente oxidada em cistina, de forma que a concentração de cisteína é significativamente reduzida após a preparação e equilíbrio do meio em uma incubadora (SAGARA; MIURA; BANNAI, 1993). Um estudo anterior demonstrou que apenas 40 e 3% de uma concentração inicial de 0,6 mM de cisteína no meio de cultivo permaneceram, respectivamente, após 3 e 24 horas de incubação (DE MATOS; FURNUS; MOSES, 1996). Para contornar esta situação, seria altamente desejável desenvolver uma forma de proporcionar a liberação lenta e gradual de cisteína no meio, de forma a manter sua disponibilidade por mais tempo durante o cultivo.

Vesículas constituídas de camadas lipofílicas foram inicialmente desenvolvidas para atuarem como modelos que mimetizam membranas biológicas (WALDE et al., 2010; SANDERSON, 2012). Porém, mais recentemente, têm sido avaliadas como potenciais nanoferramentas, visando o controle da liberação de drogas encapsuladas em seu interior (WATKINS et al., 2015). Estas vesículas são diferenciadas de acordo com a quantidade de camadas que possuem (unilamelares ou multilamelares) e seu tamanho (pequenas ou lipossomos, grandes e gigantes) (LASIC, 1988). Devido ao seu maior tamanho de 10 μm a 100 μm (BATHIA et al., 2015), as vesículas unilamelares gigantes (do inglês “giant unilamellar vesicle” – GUV) são particularmente interessantes para serem empregadas como carreadoras de macromoléculas biológicas (JIMÉNEZ et al., 2013). Adicionalmente, as GUVs têm um interessante potencial para serem utilizadas como marcadoras do estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro*, já que são extremamente sensíveis à ação das ROS (ITRI et al., 2014; RUNAS; MALMSTADT, 2015).

Atualmente há diversas aplicabilidades das GUVs nas biotecnologias em desenvolvimento (JIMÉNEZ et al., 2013; ITRI et al., 2014; AOKI; SCHRODER, 2015), no entanto, as GUVs nunca foram empregadas nas biotecnologias reprodutivas, especificamente no sistema de produção *in vitro* de embriões.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar o comportamento das GUVs co-cultivadas *in vitro* com embriões bovinos, sua embriotoxicidade e a sua efetividade como carreadora de um antioxidante (cisteína) no meio de cultivo em situação de estresse oxidativo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar os efeitos de substâncias indutoras de estresse oxidativo em células (menadiona e peróxido de hidrogênio) sobre as GUVs, mais especificamente sobre alterações em seu diâmetro e integridade; avaliar a embriotoxicidade das GUVs co-cultivadas *in vitro* com embriões bovinos; e avaliar a viabilidade da utilização de GUVs como veículo carreador para o fornecimento do antioxidante cisteína no meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

3 HIPÓTESE

As GUVs co-cultivadas *in vitro* com embriões bovinos podem atuar como doadoras de antioxidante (cisteína) ao meio de cultivo em condição de estresse oxidativo.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS

A PIV consiste em três etapas essenciais conduzidas em laboratório: a maturação *in vitro* (MIV), seguida da fertilização *in vitro* (FIV) dos oócitos e o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões resultantes. A adequada maturação dos oócitos depende da sincronia de eventos que ocorrem no núcleo (com a separação dos cromossomos - maturação meiótica), no citoplasma (maturação citoplasmática), bem como as

alterações moleculares, como armazenamento de mRNA, proteínas e fatores de transcrição (FERREIRA et al., 2009).

Todos esses eventos dependem da influência das células foliculares (células do cumulus - CC), conectadas ao oócito (complexo cumulus-oócito) por via junções das comunicantes (junções gap). Enquanto estão inclusos no folículo ovariano, antes do pico pré-ovulatório de hormônio luteinizante (LH), a meiose dos oócitos está bloqueada na fase de diplóteno da prófase I devido aos altos níveis do segundo mensageiro monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), o qual favorece a inatividade do fator promotor de maturação (MPF) nos oócitos (PICTON; BRIGGS; GOSDEN, 1998; JONES, 2004).

O AMPc é produzido nas células do cumulus a partir da ação da adelinato ciclase (AC) sobre a molécula de adenosina trifosfato (ATP), sendo então transportado para o oócito via junções gap. Outro nucleotídeo cíclico importante no bloqueio meiótico é o monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) que impede a ativação da enzimas fosfodiesterase 3A (PDE3A - oócito) e, conseqüentemente, permite a manutenção elevada dos níveis de AMPc e impede a retomada da meiose (DEKEL; ABERDAM; SHERZLY, 1984; ADHIKARI; LIU, 2014; FRANCIOSI et al., 2014).

Essa fase de bloqueio meiótico é caracterizada pela presença do envelope ou membrana nuclear, denominada de vesícula germinativa (VG) (EDRY et al., 2006). Após o pico de LH, ou através da remoção dos oócitos do ambiente folicular e posteriormente submetidos ao cultivo *in vitro* na presença reagentes adequados, ocorre a progressão da maturação nuclear através da atividade do MPF que favorece a quebra da vesícula germinativa (do inglês, "germinal vesicle breakdown" - GVBD), seguida pela condensação cromossômica e formação do fuso da metáfase I (estádio de metáfase I - MI) (JONES, 2004).

A extrusão do primeiro corpúsculo polar (PCP) contendo metade do conjunto de cromossomos do oócito encerra a primeira divisão meiótica. Logo inicia-se a fase de metáfase II (MII) da segunda divisão meiótica, fase em que os oócitos permanecerão bloqueados (Figura 1) até a penetração do espermatozoide, que desencadeará a extrusão do segundo corpúsculo polar e conclusão do ciclo meiótico com posterior desenvolvimento embrionário (HURK; ZHAO, 2005; ADHIKARI; LIU, 2014; SOVERNIGO et al., 2017).

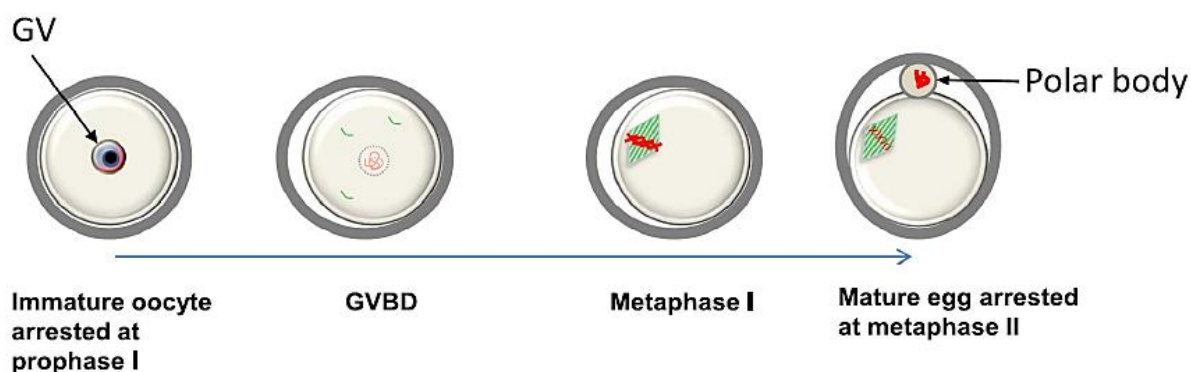


Figura 1. Representação esquemática da progressão da maturação nuclear oocitária, com início no estágio de vesícula germinativa (VG) da prófase I e conclusão com a extrusão do primeiro corpúsculo polar da metáfase II. Fonte: ADHIKARI; LIU, 2014.

Concomitante aos eventos que ocorrem durante a maturação nuclear nos oócitos, também ocorre a maturação citoplasmática, a qual é necessária para a aquisição da competência do oócito. Esses eventos compreendem a redistribuição das organelas, especialmente o posicionamento correto dos grânulos na periferia do oócito e a migração das mitocôndrias em direção perinuclear, além da síntese de proteínas. Todos esses eventos são importantes para o momento da fertilização e desenvolvimento embrionário inicial (PICTON et al., 1998; HURK; ZHAO, 2005; FERREIRA et al., 2009).

A aquisição da competência para o desenvolvimento embrionário depende do sucesso dos eventos que ocorrem durante a maturação. Apesar da utilização intensiva da PIVE, tanto na ciência, buscando inovação na melhora da qualidade oocitária e resultados de produção embrionária, como para finalidades comerciais com animais de alto valor zootécnico, as taxas de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* tem se mantido em torno de 40% (GUIMARÃES et al., 2015; KUSSANO et al., 2016). Estes índices diferem do que acontece *in vivo*, em que as taxas de oócitos que chegam à fase de desenvolvimento embrionário podem chegar a até 70% (RIZOS et al., 2002).

Uma das explicações para esta diferença é que, *in vivo*, o ambiente reprodutivo materno fornece melhores condições para o momento da fertilização e posterior desenvolvimento dos zigotos, devido às menores concentrações de oxigênio e à presença de agentes antioxidantes no folículo e no oviduto (RIZOS et al., 2002). Já no sistema *in vitro*, sabe-se que o ambiente de cultivo pode afetar a qualidade dos gametas e embriões, além da necessidade de frequente manipulação com consequente exposição à luz ultravioleta e a alta tensão de oxigênio, que propicia a exacerbada produção das ROS e culmina com a geração de estresse oxidativo (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; ROCHA-FRIGONI et al., 2013)

4.2 ESTRESSE OXIDATIVO

As ROS, também denominadas de radicais livres, são metabólitos provenientes principalmente da fosforilação oxidativa mitocondrial, processo de redução do oxigênio (O_2) utilizado pelas células a fim de gerar energia na forma de ATP (DOWLING; SIMMONS, 2009). A cadeia respiratória mitocondrial é a principal fonte endógena de ROS, mas parte dos radicais livres também são produzidos no citosol (SUMIMOTO, 2008). Os principais radicais livres produzidos por oócitos, embriões e células do cumulus são o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH^\cdot$) (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; BASINI et al., 2008; DOWLING; SIMMONS, 2009)

Em condições fisiológicas, há interação de elétrons com o oxigênio molecular na cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, dando origem ao O_2^- (redução de um elétron), o qual é convertido em H_2O_2 (redução de dois elétrons) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD). Este pode ser convertido em $OH^\cdot$ (redução de três elétrons) através da ação do sistema enzimático, glutathione peroxidase (GPX) ou catalase (CAT), ou ser convertido em H_2O (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; LUSHCHAK, 2014; SUMIMOTO, 2008).

A homeostase celular é mantida através do equilíbrio entre a produção e a eliminação das ROS (ZHAO et al., 2017), que exercem importante função nos processos fisiológicos de vias de sinalização celular, ativação de fatores de transcrição nuclear, expressão gênica e defesa imunológica (BRESCHIANI; DA CRUZ;

GONZÁLEZ-GALLEGO, 2015). No entanto, quando há desequilíbrio entre a produção de ROS e os mecanismos celulares antioxidantes intrínsecos, se estabelece a condição de estresse oxidativo (FEUGANG et al., 2003).

As ROS são instáveis e reativas e estão em constante busca de elétrons a fim de manter sua estabilidade (DELEUZE; GOUDET, 2010). A composição das membranas biológicas com lipídios insaturados (fosfolipídios de membranas) as torna mais sensíveis aos danos provocados pelas ROS, levando à oxidação lipídica decorrente da condição de estresse oxidativo (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; RILEY, 1994; RISKE et al., 2009).

Outras consequências prejudiciais bem conhecidas são: lesão celular e tecidual, oxidação no DNA, alteração no transporte de metabólitos, depleção de ATP, atraso no desenvolvimento embrionário e apoptose (BRESCHIANI; DA CRUZ; GONZÁLEZ-GALLEGO, 2015). Isto ocorre devido às elevadas concentrações de ROS, que são capazes de atravessar membranas celulares por difusão e promover diversos danos aos gametas e embriões devido às modificações moleculares nos lipídeos, proteínas e nucleotídeos (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; TAMURA et al., 2012). Os danos mitocondriais decorrentes das ROS estão diretamente relacionados ao retardo no desenvolvimento embrionário e às alterações metabólicas que culminam em apoptose (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; TAMURA et al., 2012). Outro dano que culmina em apoptose é o estresse gerado ao retículo endoplasmático, que aciona uma resposta adaptativa às proteínas mal enoveladas (UPR, do inglês “Unfolded Protein Response”), visando restaurar a homeostase celular (ALI et al., 2017).

Fatores exógenos também induzem a produção de ROS e afetam o desenvolvimento embrionário, como as condições de CIV, tal como a composição dos meios com excesso de glicose, presença de metais como Cobre (Cu) e Ferro (Fe) que são indutores de ROS através da reação de Fenton, atmosfera gasosa com alta tensão de O₂, exposição prolongada à luz ultravioleta (IWATA et al., 1998; GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; LOPES; LANE; THOMPSON, 2010). O momento da fertilização e a fase de desenvolvimento embrionário inicial são eventos onde ocorre o pico de consumo do oxigênio, com concomitante aumento da produção das ROS (LOPES; LANE; THOMPSON, 2010). Portanto, a monitorização da ocorrência de

condição de estresse oxidativo em cultivo de embriões pode ser utilizada com a finalidade de reduzir danos celulares causados pelas ROS, melhorando, consequentemente, os índices de produção.

A utilização de compostos indutores de estresse oxidativo é considerada uma importante ferramenta em estudos dos danos deletérios causados pelas ROS. A menadiona, ou vitamina K₃, é uma naftoquinona que, na presença de oxigênio, promove a geração de O₂⁻, H₂O₂ e outras ROS (MONKS et al., 1992), consequentemente resultando em apoptose e morte celular (MOSS; PONTES; HANSEN, 2009). Desta forma, a utilização da menadiona como geradora indireta de estresse oxidativo em sistemas de cultivo *in vitro* pode ser um modelo interessante para a avaliação do efeito protetor ou promotor de sobrevivência de drogas específicas, tais como antioxidantes.

4.3 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são substâncias capazes de reduzir a oxidação de substratos oxidáveis, sendo classificados como compostos enzimáticos e não enzimáticos (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001). Ambos possuem papel determinante na manutenção do balanço redox intracelular e extracelular, evitando que ocorra excesso na produção de ROS ou deficiência no sistema antioxidante intrínseco de gametas e embriões (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; TAKAHASHI et al., 1993).

Vitaminas A, C e E, piruvato, hipotaurina, taurina, glutatona (GSH) e cisteamina (CSH) são considerados compostos não enzimáticos. O sistema antioxidante enzimático é representado pelas enzimas SOD, catalase e peroxidases, como a GPX, glutatona redutase (GR), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn) superóxido dismutase (SOD) (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001).

A GSH é o principal sistema antioxidante não enzimático que está presente no meio intracelular de oócitos e embriões, e que mantém o sistema de proteção celular íntegro (TAKAHASHI et al., 1993). É composta pelos aminoácidos glutamato, cisteína e glicina, sendo que a L-cisteína extracelular é a molécula precursora para sua síntese.

A síntese da GSH ocorre no citosol das células em duas etapas: primeiramente, a enzima γ -7 glutamilcisteína sintetase catalisa a síntese da γ -glutamyl-cisteína a partir do glutamato e da cisteína; posteriormente, na presença da GSH sintetase, a glicina é adicionada no terminal C da γ -glutamyl-cisteína, promovendo a retirada das ROS (DELEUZE; GOUDET, 2010).

A eliminação das ROS ocorre pelo processo de redução de duas moléculas de GSH e H_2O_2 sob a ação da enzima GPX, resultando em sua forma oxidada GSSH e duas moléculas de água (H_2O). Logo, a GSSH na presença do NADPH sob a ação da GR é reduzida em GSH, equilibrando assim o sistema redox. A SOD, através da ação do antioxidante enzimático MnSOD presente na mitocôndria de oócitos e embriões, atua dismutando os radicais superóxidos em H_2O_2 , que posteriormente será eliminado novamente pela GPX ou pela catalase (DE MATOS; FURNUS, 2000; GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; DELEUZE; GOUDET, 2010; CALABRESE; MORGAN; RIEMER, 2017).

Estudos anteriores demonstraram que a suplementação do meio de MIV com compostos tiol, como β -mercaptoetanol, cisteína ou cistina, melhorou significativamente a fecundação e o posterior desenvolvimento embrionário até a fase de 6 a 8 células, devido ao aumento e manutenção dos níveis de GSH (DE MATOS; FURNUS, 2000).

A adição de cisteína ao meio de cultivo reduz os níveis intracitoplasmáticos de ROS (ZHOU et al., 2016). No entanto, é instável e rapidamente oxidada à cistina, a qual não pode ser captada pelas células, prejudicando a síntese de novo GSH. Desta forma, é importante utilizá-la em associação com a cisteamina, que atua reduzindo a cistina à cisteína, consequentemente aumentando a síntese de GSH (TAKAHASHI et al., 1993; BANNAI, 1984; MERTON et al., 2013).

Além dos radicais livres produzidos pelas células em cultivo, também há os que são produzidos extracelularmente, principalmente a partir dos meios de cultivo, incluindo radiação, aumento nas temperaturas, drogas, ou seja, compostos que ao serem metabolizados dão origem aos radicais livres (RILEY, 1994). Desta forma, torna-se também necessária a suplementação dos meios de cultivo com antioxidantes de ação extracelular. Dentre estes, a catalase, que é um agente enzimático, atua como

antioxidante extracelular, promovendo a retirada da ROS H_2O_2 do meio extracelular (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001).

Sendo assim, a adição de antioxidantes intracelulares ou extracelulares em sistemas de CIV oferece melhor suporte para o desenvolvimento embrionário.

4.4 VESÍCULAS LIPÍDICAS UNILAMELARES

A fim de compreender a biofísica e os aspectos fundamentais na cinética das membranas, estruturas denominadas como “vesículas lipídicas” foram desenvolvidas, buscando obter modelos que mimetizam membranas biológicas (WALDE et al., 2010 e SANDERSON, 2012). Essas estruturas são compartimentos esféricos constituídos por uma ou mais camadas de moléculas lipídicas, denominadas de membranas, que contém líquido em seu interior (WALDE et al., 2010). São consideradas como um sistema mais próximo ao fisiológico, devido às características de tamanho e estrutura semelhantes às membranas celulares e organelas (DIMOVA, 2012).

As membranas podem ser compostas por um único tipo de lipídeo ou pela associação de diferentes fosfolipídios em sua forma líquida. Os mais utilizados são o 1,2-dioleoil-sn-glicero-3- fosfocolina (DOPC) (MERTINS et al., 2014), fosfolipídios 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (POPC) e 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DMPE) (RISKE et al., 2009).

As vesículas lipídicas são classificadas de acordo com a quantidade de camadas que possuem, sendo consideradas unilamelares ou multilamelares, e em relação ao seu tamanho, podendo ser pequenas, grandes e gigantes (LASIC, 1998). As vesículas unilamelares pequenas (do inglês, “small unilamellar vesicles” – SUV ou lipossomos) possuem tamanho variável entre 50 nm a 100 nm as vesículas unilamelares grandes (“large unilamellar vesicles” - LUV), entre 100 nm a 500 nm; e as vesículas unilamelares gigantes (“giant unilamellar vesicles” - GUV), entre 10 μ m a 100 μ m (BHATIA et al., 2015) (Figura 2).

Os lipossomos (DIMOVA, 2012) são empregados como nanobiotecnologia, devido à sua particularidade no diâmetro. Considera-se um nanomaterial as partículas com diâmetro entre 1 nm e 100 nm ou partículas maiores que esse diâmetro, mas que se comportam de forma efetiva e possuem propriedades únicas; WATKINS et al.,

2015), tal como auxílio no transporte e entrega de fármacos a nível molecular para determinados tecidos (KIM; RUTKA; CHAN, 2010).

As GUVs são amplamente estudadas e utilizadas como ferramentas para observações das modificações físicas nas bicamadas fosfolipídicas e nos domínios lipídicos (“rafts lipids”), buscando compreender e examinar como tais mudanças influenciam na função celular. Estas alterações ocorrem em escalas semelhantes ao tamanho celular, possibilitando a observação clara e em tempo real através da microscopia de fluorescência, devido à presença de lipídios fluorescentes em suas estruturas (WESOLOWSKA et al., 2009; WALDE et al., 2010; DIMOVA, 2012; ITRI et al., 2014; AROUSH; YEHUDAI-RESHEFF; KEREN, 2015).

As vesículas gigantes são também consideradas ótimas ferramentas em estudos com estresse oxidativo, pois sua composição fosfolipídica as torna sensíveis aos danos causados pelos ROS, culminando em peroxidação lipídica (ITRI et al., 2014).

É possível identificar, através da microscopia óptica, a sequência de eventos que ocorrem na estrutura das GUVs após a indução do estresse oxidativo em resposta ao estímulo com substâncias fotooxidativas, como exemplo o azul de metileno (RISKE et al., 2009; MERTINS et al., 2014).

Os radicais livres interagem com as duplas ligações dos fosfolipídios presentes nas membranas das GUVs e causam hidroperoxidação lipídica que, consequentemente, leva ao aumento da área associado ou não às flutuações nas membranas. No interior das GUVs encontram-se alguns lipídios internos conhecidos como “buds”, os quais podem ser liberados no processo de estresse oxidativo através da abertura de poros nas membranas (HEUVINGH; BONNEAU, 2009; RISKE et al., 2009; MERTINS et al., 2014; AOKI et al., 2015)

Além de serem importantes para o estudo das membranas, as GUVs podem ser aplicadas como ferramentas para englobar macromoléculas, como exemplo, citocinese bacteriana, por se compartimentalizar de forma semelhante à uma célula (JIMÉNEZ et al., 2013). Possuem capacidade de encapsular substâncias em seu interior, como enzimas (WALDE; ICHIKAWA, 2001), e serem produzidas através da associação de fosfolipídios e antioxidantes para proteção de membranas lipídicas (LIU

et al., 2018). Desta forma, são atualmente consideradas uma ótima ferramenta para tais aplicações.

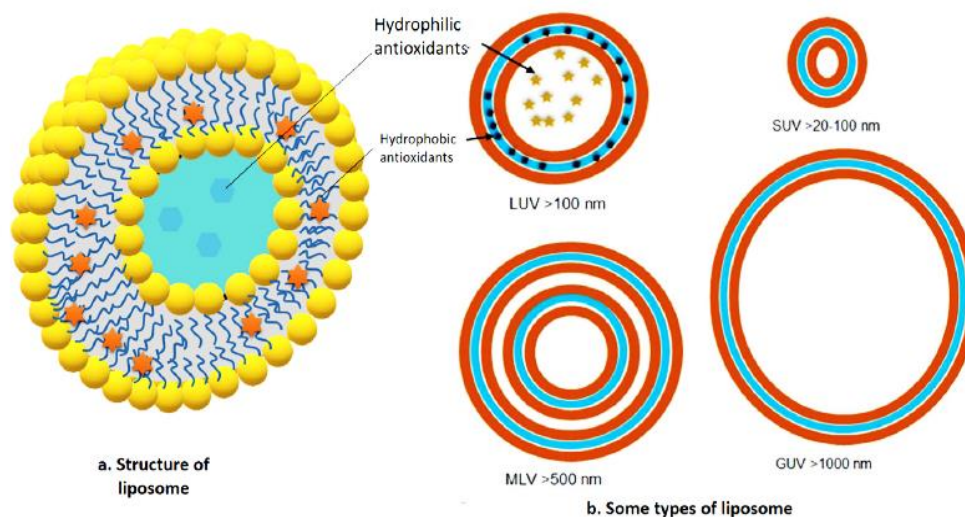


Figura 2. Figura esquemática baseada nos diferentes tamanhos e quantidades de lamelas das vesículas lipídicas. (a) Estrutura do lipossomo com antioxidantes encapsulados do tipo hidrofílico e hidrofóbico. (b) Tamanhos e lamelaridades das vesículas lipídicas multilamelares (MLV), vesícula lipídica pequena (SUV), vesícula lipídica grande (LUV) e vesícula lipídica gigante (GUV) (TRAN; MOON; LEE, 2019).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 REAGENTES QUÍMICOS E MEIOS

Os reagentes foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), caso contrário estão especificados no texto. Materiais plásticos e tubos foram obtidos da empresa Corning Inc. (Acton, MA, USA).

O meio de MIV utilizado foi o TCM-199 suplementado com 0,2 mM de piruvato, 25 mM bicarbonato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 0,5 µg/mL de hormônio folículo estimulante (FSH; Folltropin-V; Bioniche Animal Health, Ontario, Canada), 100 UI/mL de gonadotrofina coriônica humana (hCG; Vetecor; Hertape Calier, Juatuba, MG, Brasil) e 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA). O meio de fecundação consistiu de Tyrode-Albumina-Lactato-Piruvato (TALP) contendo 0,2

mM de piruvato, 25 mM bicarbonato de sódio, 13 mM de lactato de sódio, 50 µg/mL de amicacina, 6 mg/mL albumina sérica bovina (BSA) livre de ácidos graxos, 10 µg/mL de heparina, 20 µM de penicilamina, 10 µM hipotaurina e 2 µM epinefrina (meio TALP-FIV). O meio para cultivo dos embriões utilizado foi o “Synthetic Oviduct Fluid” modificado (mSOF), suplementado com 0,2 mM de L-glutamina, 0,34 mM citrato de sódio, 2,8 mM de myo-inositol, 2% aminoácidos essenciais, 1% aminoácidos não essenciais, 0,2 mM piruvato, 50 µg/mL de amicacina, 5 mg/mL de BSA fração V e 2,5% de SFB.

Nos tratamentos onde o antioxidante cisteína (Sigma C7352) foi diluído diretamente no meio mSOF (grupos descritos no delineamento experimental), o preparo foi realizado a cada dia do experimento para obtenção da concentração final de 0,6 mM, como previamente preconizada por ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003 e ROCHA-FRIGONI et al., 2014.

5.2 ELETROFORMAÇÃO E FORMA DE AVALIAÇÃO DAS VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES (GUVs)

Foi inicialmente preparada uma solução estoque do fosfolipídio 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina (DOPC, Avanti Polar Lipids, Inc.) em clorofórmio, na concentração de 10^{-3} mol/L. Foi adicionado 0,5 mol% de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) (Liss Rod PE, Avanti Polar Lipids, Inc) à solução de DOPC para a marcação da membrana, visando sua observação em microscopia de fluorescência. Em seguida, essa solução foi espalhada em um substrato de vidro recoberto com óxido de estanho dopado com índio (ITO, do inglês “Indium Tin Oxide”), sendo então seco a vácuo por 1 hora. Uma segunda placa idêntica foi usada para cobrir uma câmara de incubação delimitada por um espaçador de teflon. Na sequência, a câmara foi preenchida com a solução de eletroformação, constituída por: sacarose a 0,26 mol/L para proceder à eletroformação de GUVs tradicionais; ou de sacarose a 0,26 mol/L e 3×10^{-3} mol/L de cisteína para proceder à eletroformação de GUVs preenchidas com cisteína [GUV(Cist 3mM)]; ou ainda de sacarose a 0,26 mol/L e 129×10^{-3} mol/L de cisteína para proceder à eletroformação de GUVs preenchidas com cisteína [GUV(Cist 129mM)]. A concentração de sacarose

utilizada para a formulação da solução de eletroformação foi determinada para ser iso-osmótica ao meio mSOF, cuja osmolaridade (260 mOsm kg^{-1}) foi determinada em um osmômetro (Osmomat 3000). Tanto a sacarose quanto a cisteína foram previamente diluídas em água ultrapura (Milli-Q). Finalmente, uma tensão AC de 2,0 V a uma frequência fixa de 10 Hz (Gerador de Função Digital Minipa MFG-4202, Minipa do Brasil Ltda) foi aplicada através da câmara por no mínimo 3 horas. Posteriormente, a solução contendo as GUVs foi removida da câmara com auxílio de uma seringa (3 mL) e armazenada a 4°C por até uma semana.

As avaliações das GUVs foram realizadas em microscópio invertido equipado com fluorescência (Nikon Eclipse Ti-S), em objetiva de 40x, utilizando um filtro com excitação na faixa de comprimento de onda de 515 a 575 nm e emissão de 560 a 680 nm. As imagens obtidas por meio do Software Nikon NIS-Elements AR (versão 3.0) foram posteriormente avaliadas com auxílio do programa Image J utilizando uma reta, mensurando de uma extremidade a outra da GUV para determinação do seu diâmetro.

5.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5.3.1 EXPERIMENTO I: EFEITO DA MENADIONA SOBRE A INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM GUVs CULTIVADAS *IN VITRO*

A menadiona (MD) é uma substância utilizada na indução de estresse oxidativo pela capacidade de produzir $\text{O}_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e outras ROS em células cultivadas na presença de oxigênio (ITRI et al., 2014). Desta forma, a utilização da menadiona como geradora de estresse oxidativo em sistemas de cultivo *in vitro* pode ser um modelo interessante para a avaliação do efeito protetor ou promotor de sobrevivência de drogas específicas, tais como antioxidantes. As GUVs, por sua vez, são estruturas sensíveis ao estresse oxidativo, que induz modificações estruturais sobre as mesmas e causa, principalmente, alterações em seu diâmetro (CAETANO et al., 2007; RISKE et al., 2009; MERTINS et al., 2014; WEBER et al., 2014; AOKI; SCHRODER, 2015). Desta forma, a variação no diâmetro das GUVs foi utilizada como parâmetro para avaliar a geração de estresse oxidativo induzido de forma indireta no sistema de cultivo pela menadiona.

GUVs tradicionais foram eletroformadas e então diluídas em mSOF (20% v/v). Desta solução, 500 μ L foram transferidos para placas de quatro poços, sendo que a cada poço foi acrescentada a menadiona em concentrações crescentes, de acordo com os seguintes tratamentos: grupo controle (GUVs cultivadas na ausência de menadiona) e grupos MD 1,0 mM, MD 2,5 mM, MD 5,0 mM, MD 7,5 mM e MD 10,0 mM, onde as GUVs foram cultivadas na presença de, 1 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10 mM de menadiona, respectivamente. As placas contendo as GUVs foram cultivadas em incubadora por um período de 72 horas a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar, com máxima umidade. O diâmetro das GUVs (em μ M) foi mensurado antes do cultivo (D0) e novamente ao término do cultivo (após 72 horas - D3).

5.3.2 EXPERIMENTO II: EFEITO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE A INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO EM GUVS CULTIVADAS *IN VITRO*

O H₂O₂ é um dos principais e mais potentes radicais livres produzidos por células em decorrência do estresse oxidativo (GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001). Este experimento foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito direto deste radical livre sobre as GUVs.

As GUVs tradicionais foram eletroformadas e diluídas em mSOF (20% v/v), assim como descrito para o experimento I. Desta solução, 500 μ L foram transferidos para poços de placas de cultivo, sendo que a cada poço foi acrescentado H₂O₂ em concentrações crescentes, de acordo com os seguintes tratamentos: grupo controle (GUVs cultivadas na ausência de H₂O₂) e grupos H₂O₂ 0,01 mM, H₂O₂ 0,05 mM, H₂O₂ 0,1 mM, H₂O₂ 0,5 mM, e H₂O₂ 1,0 mM, onde as GUVs foram cultivadas na presença de 0,01 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,5 mM de H₂O₂ e 1 mM de H₂O₂, respectivamente. As placas contendo as GUVs foram cultivadas em incubadora por um período de 72 horas a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar, com máxima umidade. O diâmetro das GUVs foi mensurado no D0 e novamente no D3, da mesma forma como descrito para o experimento I.

5.3.3 EXPERIMENTO III: INDUÇÃO DE ESTRESSE OXIDATIVO PELA MENADIONA EM EMBRIÕES CULTIVADOS *IN VITRO* NA PRESENÇA DE GUVs

Este experimento foi desenvolvido com o objetivo de avaliar: (1) a embriotoxicidade das GUVs; (2) as concentrações intracitoplasmáticas de ROS em embriões co-cultivados com GUVs; e (3) o comportamento das GUVs (morfometria e quantidade) quando co-cultivadas com embriões submetidos ao estresse oxidativo induzido pela menadiona.

Prováveis zigotos produzidos *in vitro* foram removidos das gotas de fertilização no D1, lavados e transferidos para placas de poços em volume de 500 μ L de meio de cultivo mSOF com algumas suplementações, de acordo com os tratamentos a seguir: 1) grupo controle (n = 100): embriões cultivados em meio mSOF; 2) grupo GUV (n = 104): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de GUVs tradicionais; 3) grupo GUV+MD 5,0 μ M (n = 104): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de GUVs tradicionais e suplementado com 5,0 μ M menadiona do D6 ao D7; e 4) grupo GUV+MD 7,5 μ M (n = 100): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de GUVs tradicionais e suplementado com 7,5 μ M menadiona do D6 ao D7 (MOSS; PONTES; HANSEN, 2009).

Os embriões foram cultivados a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar, com umidade máxima por 7 dias. Como um dos objetivos deste experimento foi avaliar as GUVs, não foi realizada troca de meio (feeding) durante todo o período do cultivo. A taxa de clivagem foi avaliada no D3 e a taxa de desenvolvimento embrionário foi avaliada no D7, quando os blastocistos obtidos foram avaliados quanto ao conteúdo intracelular de ROS. As GUVs foram avaliadas quanto ao diâmetro e quantidade (expressa em porcentagem), sendo que a porcentagem de GUVs no último dia de cultivo (D7) foi determinada em relação ao total de GUVs presentes no primeiro dia (D1).

5.3.4 EXPERIMENTO IV: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE GUVs COMO CARREADORAS DE CISTEÍNA NO MEIO DE CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS.

Este experimento teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização de GUVs como veículo carreador para o fornecimento de antioxidante no meio de cultivo de embriões bovinos. Para tanto, comparou-se o efeito antioxidante da cisteína diluída

no meio de cultivo [concentração de 0,6 mM, conforme recomendada em estudos anteriores (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003; ROCHA-FRIGONI et al., 2014) com o efeito da cisteína encapsulada em GUVs [GUV(Cist 3mM)]. Conforme detalhado acima, as GUV(Cist 3mM) foram eletroformadas em solução contendo cisteína na concentração de 3 mM, sendo subsequentemente diluídas no meio de cultivo (20% v/v) para que a concentração final máxima de cisteína no meio atingisse 0,6 mM após a possível liberação total do conteúdo das GUVs. Porém, apesar desta concentração da solução de eletroformação ter sido calculada para que não fosse ultrapassado o limite de 0,6 mM após o extravasamento, existe a possibilidade de que nem todas as GUVs sejam alteradas pelo estresse oxidativo, o que levaria a uma concentração de cisteína extravasada no meio menor do que o preconizado. Sendo assim, comparou-se também o efeito da cisteína encapsulada em GUVs em maior concentração (129 mM: grupo GUV(Cist 129mM)], cuja concentração final máxima de cisteína no meio seria de 25,8 mM após a total liberação pelas GUVs. Apesar desta concentração final ser muito superior à preconizada (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003; ROCHA-FRIGONI et al., 2014), foi avaliada por ser isosmótica ao meio SOF, o que impediria um possível efeito de variação da osmolaridade entre os meios interno e externo das GUVs, levando à sua desestabilização.

Prováveis zigotos foram cultivados em placas de poços em volume de 500 μ L de meio mSOF com algumas suplementações, de acordo com os tratamentos: 1) controle (n = 111): embriões cultivados em meio mSOF; 2) Cist (n = 112): embriões cultivados em meio mSOF suplementado com 0,6 mM cisteína (do D1 ao D7); 3) MD (n = 111): embriões cultivados em meio mSOF suplementado 5,0 μ M menadiona a partir do D6 (do D6 ao D7); 4) MD+Cist (n = 110): embriões cultivados em meio mSOF suplementado com 0,6 mM cisteína (do D1 ao D7) e com 5,0 μ M menadiona a partir do D6; 5) GUV(Cist 3mM) (n = 116): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de GUVs eletroformadas com cisteína na concentração de 3 mM (do D1 ao D7); 6) GUV(Cist 3mM)+MD (n = 113): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de GUVs eletroformadas com cisteína na concentração de 3 mM (do D1 ao D7) e suplementado com 5,0 μ M menadiona a partir do D6; 7) GUV(Cist 129 mM) (n = 112): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de GUVs eletroformadas com cisteína na concentração de 129 mM (do D1 ao D7); 8)

GUV(Cist 129 mM)+MD (n = 110): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de GUVs eletroformadas com cisteína na concentração de 129 mM (do D1 ao D7) e suplementado com 5,0 μ M menadiona a partir do D6;

Os embriões foram cultivados a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar, com umidade máxima por até 7 dias. Como um dos objetivos deste experimento era avaliar o efeito da cisteína incluída nas GUVs e adicionada ao meio no início do cultivo, não foi realizada troca de meio (feeding) durante todo o período do cultivo. A taxa de clivagem foi avaliada no D3 e a taxa de desenvolvimento embrionário foi avaliada no D7. Os blastocistos obtidos foram avaliados quanto ao conteúdo intracelular de ROS.

5.4 SELEÇÃO E MATURAÇÃO DE OÓCITOS

Ovários bovinos foram obtidos em abatedouro e transportados até o laboratório em solução salina esterilizada em temperatura entre 30 e 35°C. Complexos cumulus-oócitos (COCs) foram recuperados através de punções de folículos antrais (3 a 8 mm de diâmetro) realizadas com auxílio de seringa de 10 mL acoplada a uma agulha calibre 18G. Oócitos com pelo menos quatro camadas de células do cumulus e citoplasma homogêneo foram selecionados em fluido folicular centrifugado suplementado com penicilina-estreptomicina 75 μ g/mL. Os COCs selecionados foram então lavados e transferidos para placas de 4 poços (NUNC, Nunclon Delta Tratado 4-Well IVF Dish, Dinamarca) contendo 500 μ L de meio MIV (25 a 30 estruturas por poço), sem óleo mineral. O cultivo foi realizado durante 22 horas a 38,5°C em atmosfera de 5% de CO₂ em ar, com umidade máxima.

5.5 FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* E CULTIVO DE EMBRIÕES

Palhetas de sêmen criopreservado foram descongeladas a 37°C por 30 segundos e o conteúdo foi submetido à centrifugação em gradiente de densidade descontínua de Percoll (45% e 90%; GE Healthcare, Uppsala, Suécia) durante 7 minutos a 2500 x g, em temperatura ambiente. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 500 μ L de meio TALP, sendo novamente centrifugado por 5 minutos a 5000 x g. Os espermatozoides (2×10^6 células/mL) foram adicionados à gota de fertilização contendo 100 μ L do meio de fertilização TALP-FIV.

Os COCs e os espermatozoides foram co-incubados por 18 horas a 38,5°C e 5% de CO₂ em umidade máxima. O início da FIV foi definido como o dia 0 (D0).

Após a fertilização, os prováveis zigotos foram parcialmente desnudos das células do cumulus através de pipetagens. As estruturas foram então transferidas para 500 µL de meio mSOF sem óleo mineral (25 a 30 estruturas por poço) e cultivadas a 38,5°C em 5% de CO₂ em ar, com máxima umidade por até 7 dias. A taxa de clivagem foi avaliada 72 h após a inseminação (h.p.i.) e a taxa de desenvolvimento embrionário foi avaliada 168 h.p.i. (dia 7 do CIV: D7).

5.6 DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES INTRACITOPLASMÁTICAS DE ROS

O conteúdo intracelular de ROS (H₂O₂, HO•, ROO•) foi quantificado nos embriões mediante a coloração com a sonda fluorescente CellROX[®] Green Reagent (Thermo Scientific[™] - Molecular Probes, Life Technologies - C10444). Embriões obtidos no D7 foram lavados duas vezes em solução salina tampão fosfato (PBS) e incubados com 5 µM de CellROX[®] durante 30 minutos, no escuro, a 38,5°C e 5% de CO₂ em ar. Posteriormente, foram lavados duas vezes em PBS, fixados em solução de paraformaldeído 4% durante 15 minutos e novamente lavados duas vezes em PBS. Na sequência, foram permeabilizados em Triton X-100 em 0,5% em citrato de sódio 0,1% por 10 minutos, sendo em seguida corados com Hoechst 33342 (1 µg/mL) durante 15 minutos. Após lavagem em PBS, as estruturas foram montadas em lâminas e avaliadas imediatamente em microscópio invertido equipado com epifluorescência (Olympus IX51), em aumento de 20x. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram, respectivamente, de 485 nm e 520 nm para observações do CellROX e de 385 nm e 520 nm para observações do Hoechst. As imagens obtidas foram posteriormente analisadas utilizando-se o programa Q-Capture Pro Image software (Media Cybernetics, Inc. Version 5.0.1.26) para quantificação da intensidade de fluorescência emitida (dados expressos em unidade arbitrária de fluorescência - UAF). A intensidade do sinal de fundo (background) foi subtraída dos valores medidos do tratamento. Para cada embrião, a intensidade do CellROX foi normalizada pelo número de células (DNA corado pelo Hoechst).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi repetido no mínimo 3 vezes para cada avaliação proposta, em replicatas independentes. Os dados foram analisados por ANOVA utilizando o software estatístico JMP® versão 5.0.1a (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA). Quando necessário, os dados em porcentagem foram transformados em arco seno antes de serem submetidos à ANOVA. Quando um efeito estatisticamente significativo foi encontrado, comparações múltiplas das médias foram determinadas pelo teste de Tukey. Diferenças com probabilidades (P) menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram consideradas significativas. Os valores estão apresentados como média e erro padrão da média (EPM).

6. RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO I

Foi avaliado o efeito da menadiona sobre a variação do diâmetro em GUVs cultivadas *in vitro*, cujos resultados estão apresentados na Tabela 1. Não houve diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$) antes do início do cultivo (D0: variação de 16,76 a 18,92 μm entre os tratamentos) quanto após 72 horas de cultivo (D3: 17,06 a 21,59 μm).

Tabela 1. Efeito da concentração de menadiona (MD) sobre o diâmetro de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) cultivadas *in vitro* por um período de 72 horas.

Grupos	GUVs no D0*		GUVs no D3	
	Nº	Diâmetro (μm)	Nº	Diâmetro (μm)
Controle	29	18,46 $\pm$ 1,46	58	17,85 $\pm$ 0,94
MD 1,0 mM	16	16,76 $\pm$ 1,72	24	18,55 $\pm$ 1,74
MD 2,5 mM	28	17,38 $\pm$ 1,20	42	21,59 $\pm$ 1,27
MD 5,0 mM	49	17,00 $\pm$ 0,86	48	20,46 $\pm$ 0,85
MD 7,5 mM	47	16,79 $\pm$ 0,95	40	17,06 $\pm$ 0,77
MD 10,0 mM	56	18,92 $\pm$ 0,72	48	19,47 $\pm$ 0,90

Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ EPM. *D0 = dia 1 (início do cultivo); D3 = dia 3 (final do cultivo de 72 horas). Não foi observada diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P > 0,05$).

6.2 EXPERIMENTO II

Não foi observado efeito do H_2O_2 sobre o diâmetro de GUVs nos diferentes tratamentos no início do cultivo (D0: variação de 15,72 a 16,64 μM entre os tratamentos; $P>0,05$), como apresentado na Tabela 2. Todavia, no D3 foi verificada redução ($P<0,05$) no diâmetro das GUVs, nos grupos cultivados na presença das maiores concentrações de H_2O_2 avaliadas no presente estudo [Controle (18,96 μm) vs. H_2O_2 0,1 mM (17,71 μm), H_2O_2 0,5 mM (17,32 μm) e H_2O_2 1,0 mM (16,63 μm)].

Tabela 2. Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sobre o diâmetro de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) cultivadas *in vitro* por um período de 72 horas.

Grupos	GUVs no D0*		GUVs no D3	
	Nº	Diâmetro (μM)	Nº	Diâmetro (μM)
Controle	413	16,45 $\pm$ 0,24	350	18,96 $\pm$ 0,27 ^{ab}
H_2O_2 0,01mM	383	16,64 $\pm$ 0,25	304	19,16 $\pm$ 0,35 ^a
H_2O_2 0,05mM	353	16,27 $\pm$ 0,25	331	17,90 $\pm$ 0,32 ^{bc}
H_2O_2 0,1mM	308	16,21 $\pm$ 0,28	268	17,71 $\pm$ 0,30 ^c
H_2O_2 0,5mM	442	16,30 $\pm$ 0,23	283	17,32 $\pm$ 0,29 ^c
H_2O_2 1,0mM	313	15,72 $\pm$ 0,31	220	16,63 $\pm$ 0,31 ^c

Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ EPM. *D0 = dia 1 (antes do início do cultivo); D3 = dia 3 (final do cultivo de 72 horas). ^{abc}Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ($P<0,05$).

6.3 EXPERIMENTO III

Não foi observada diferença entre os tratamentos ($P>0,05$) com relação à taxa de clivagem (86,35% a 92,95%). Da mesma forma, não houve diferença ($P>0,05$) nas taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto entre o grupo controle (26,70%) e o grupo GUV (25,18%). Todavia, esses dois tratamentos diferiram ($P<0,05$) dos grupos GUV+MD 5,0 μM (6,95%) e GUV+MD 7,5 μM (0,95%), como demonstrado na Tabela 3.

As maiores concentrações intracelulares de ROS (Figura 3) em embriões bovinos, expressas em UAF, foram observadas no grupo GUV+MD 5,0 μM (16,28), o

qual diferiu ($P < 0,05$) dos grupos controle (3,76) e GUV (3,99). Embriões do grupo GUV+MD 7,5 μM não foram avaliados, pois não houve desenvolvimento de um número adequado de estruturas que permitissem realizar a avaliação.

Tabela 3. Clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* na presença de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) e submetidos ao estresse oxidativo induzido pela menadiona.

Grupos	Nº oócitos	Clivagem (%)	Blastocistos (%)
Controle	100	86,35 $\pm$ 3,38	26,70 $\pm$ 7,30 ^a
GUV	104	89,54 $\pm$ 1,43	25,18 $\pm$ 4,32 ^a
GUV+MD 5,0 μM *	104	89,75 $\pm$ 2,69	6,95 $\pm$ 3,13 ^b
GUV+MD 7,5 μM *	100	92,95 $\pm$ 2,99	0,95 $\pm$ 0,95 ^b

Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ EPM. *Os embriões foram cultivados por 7 dias, sendo que a menadiona (5,0 μM ou 7,5 μM) foi incluída no meio apenas no sexto dia de cultivo (do D6 ao D7). ^{ab}Letras diferentes na mesma coluna diferem pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

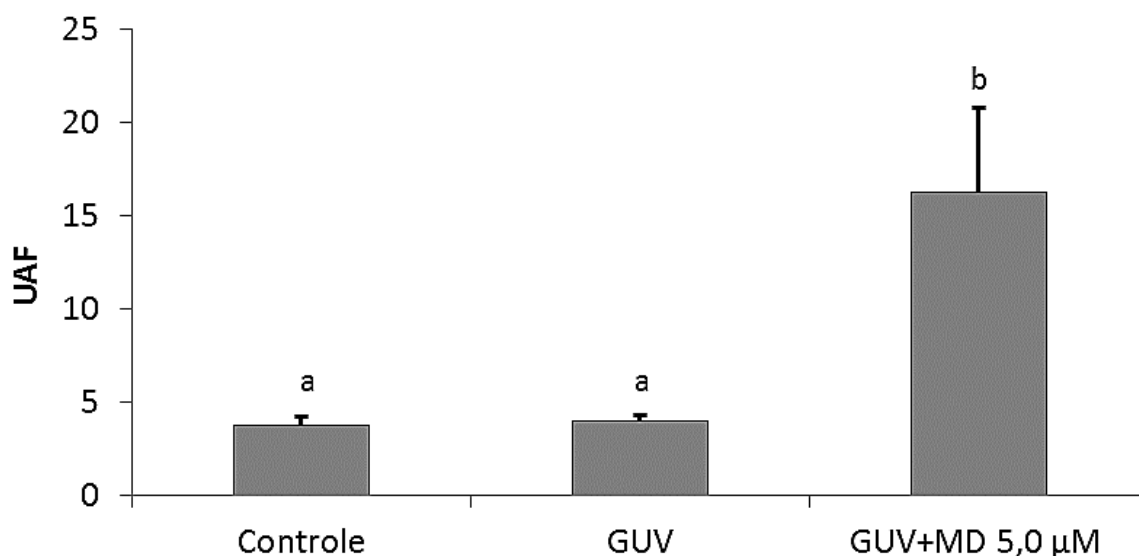


Figura 3. Concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) em embriões produzidos *in vitro* submetidos ao estresse oxidativo e cultivados na presença de vesículas unilamelares gigantes (GUVs). Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ EPM. As concentrações de ROS estão expressas em unidades arbitrárias de fluorescência (UAF). Os embriões foram cultivados por 7 dias, sendo que a menadiona (5,0 μ M) foi incluída no meio apenas no sexto dia de cultivo (do D6 ao D7). Barras com letras distintas diferem pelo Teste de Tukey ($P < 0,05$).

Não foi observada diferença ($P > 0,05$) de diâmetro em GUVs dos diferentes tratamentos antes de serem submetidas ao cultivo (D0: 14,90 a 15,30 μ M), como apresentado na Tabela 4. Todavia, no D7 foi observado aumento ($P < 0,05$) no diâmetro das GUVs do grupo GUV+MD 7,5 μ M (17,79 μ M) em relação aos grupos controle (14,63 μ M) e GUV+MD 5,0 μ M (13,49 μ M).

Tabela 4. Efeito da menadiona sobre o diâmetro de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) em co-cultivo *in vitro* com embriões.

Grupos	GUVs no D0*		GUVs no D7	
	Nº	Diâmetro (μ M)	Nº	Diâmetro (μ M)
Controle	843	14,92 $\pm$ 0,19	77	14,63 $\pm$ 0,82 ^b
MD 5,0 μ M**	708	14,90 $\pm$ 0,18	86	13,49 $\pm$ 0,59 ^b
MD 7,5 μ M	790	15,30 $\pm$ 0,19	69	17,79 $\pm$ 0,94 ^a

Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ EPM. *D0 = dia 1 (antes de iniciar o cultivo); D7 = dia 7 (final do cultivo de 168 horas). **Os embriões foram cultivados por 7 dias, sendo que a menadiona (5,0 μ M ou 7,5 μ M) foi incluída no meio apenas no sexto dia de

cultivo (do D6 ao D7). ^{ab}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Neste experimento foi também avaliada a variação do número de GUVs presentes na placa de CIV no final do cultivo (D7) em relação ao total inicial (D1), reportada em termos de porcentagem (Figura 4). Não foi observada diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$), sendo detectadas 13,6% de GUVs remanescentes no D7 no grupo controle, 21,6% no grupo GUV+MD 5,0 μ M e 13,5% no grupo GUV+MD 7,5 μ M.

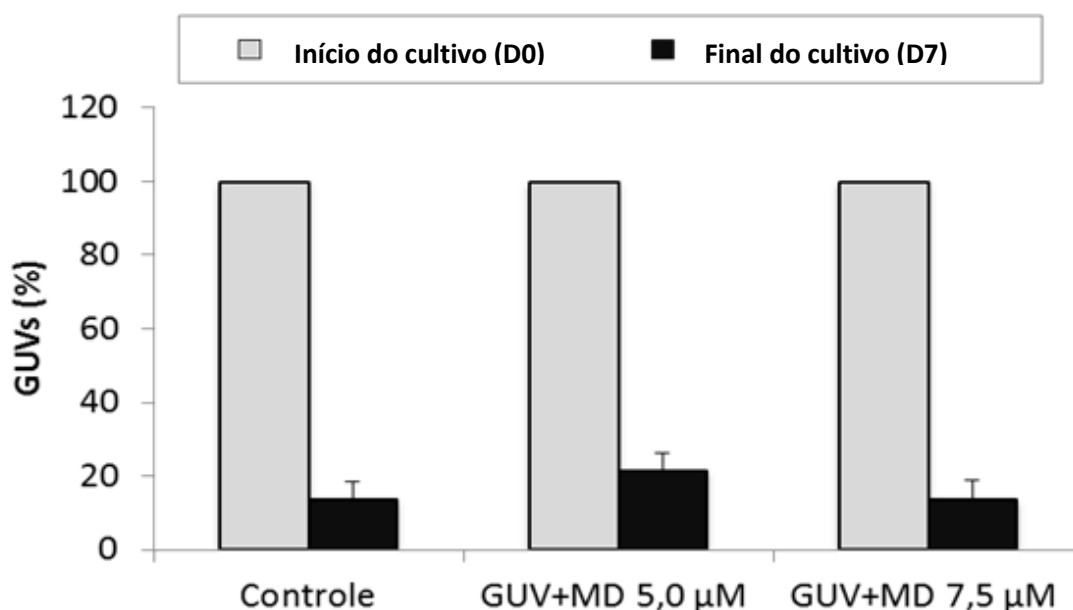


Figura 4. Porcentagem de vesículas unilamelares gigantes (GUVs) presentes na gota de cultivo *in vitro* de embriões bovinos. A porcentagem de GUVs no último dia de cultivo (D7) foi determinada em relação ao total de GUVs presentes no primeiro dia (D1). No D6 foi induzido estresse oxidativo nos embriões através da adição de menadiona em diferentes concentrações por um período de 24 horas. Não foi encontrada diferença estatística entre os tratamentos, para cada momento avaliado ($P > 0,05$).

6.4 EXPERIMENTO IV

A taxa de clivagem foi menor ($P < 0,05$) nos grupos GUV(Cist 129mM) e GUV(Cist 129mM)+MD (50,05% e 45,89%, respectivamente) do que a dos demais tratamentos (83,97% a 91,69%). A taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto foi menor ($P < 0,05$) nos grupos submetidos ao estresse oxidativo pela

menadiona (MD: 9,46%; MD+Cist: 1,19%; e GUV(Cist 3mM)+MD: 1,15%) e nos grupos cultivados com maior concentração de cisteína [GUVC(Cist 129mM): 0,0% e GUV(Cist 129mM)+MD: 0,0%] em comparação aos demais grupos (controle: 25,58%; Cist: 31,77%; e GUV(Cist 3mM): 30,16 %). Estes resultados estão sumarizados na Tabela 5.

Tabela 5. Clivagem e desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* em meio suplementado com vesículas unilamelares gigantes (GUVs) eletroformadas com cisteína (Cist) em seu interior, e submetidos ao estresse oxidativo induzido pela menadiona

Grupos	Aditivo do meio de cultivo		Nº oócitos	Clivados (%)	Blastocistos (%)
	MD*	Cisteína			
Controle	-	-	111	87,99 ± 0,92 ^a	25,58 ± 4,53 ^a
Cist	-	0,6 mM (diluída)**	112	84,65 ± 4,83 ^a	31,77 ± 0,37 ^a
MD	+	-	111	91,69 ± 1,04 ^a	9,46 ± 6,04 ^b
Cist+MD	+	0,6 mM (diluída)	110	90,01 ± 1,56 ^a	1,19 ± 1,19 ^b
GUVC(Cist3mM)	-	3 mM (na GUV)***	116	83,97 ± 5,71 ^a	30,16 ± 1,59 ^a
GUVC(Cist3mM)+MD	+	3 mM (na GUV)	113	88,37 ± 4,01 ^a	1,15 ± 1,15 ^b
GUVC(Cist129mM)	-	129 mM (na GUV)***	112	50,05 ± 4,22 ^b	0,00 ^b
GUVC(Cist129mM)+MD	+	129 mM (na GUV)	110	45,89 ± 14,80 ^b	0,00 ^b

Os dados estão apresentados na forma de média ± EPM. *Os embriões foram cultivados por 7 dias, sendo que a menadiona (5,0 µM) foi incluída no meio apenas no sexto dia de cultivo (do D6 ao D7); **Nos grupos Cist e Cist+MD, a cisteína foi diluída diretamente no meio de cultivo na concentração final de 0,6 mM; ***Nos grupos GUV(Cist 3mM) e GUV(Cist 3mM)+MD, as GUVs foram eletroformadas com 3 mM de cisteína em seu interior e foram subsequentemente diluídas no meio de cultivo (20% v/v), de forma que a concentração final máxima atingisse 0,6 mM após liberação pelas GUVs. ****Nos grupos GUV(Cist 129mM) e GUV(Cist 129mM)+MD, as GUVs foram eletroformadas com 129 mM de cisteína em seu interior e foram subsequentemente diluídas no meio de cultivo (20% v/v), de forma que a concentração final máxima atingisse 25,8 mM após liberação pelas GUVs. ^{ab}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05).

Foram avaliadas as concentrações intracelulares de ROS dos embriões produzidos (Tabela 6), com exceção dos grupos Cist+MD, GUV(Cist)+MD, GUV(Cist 129mM) e GUV(Cist 129mM)+MD, em que não houve desenvolvimento de um número adequado de estruturas que permitisse realizar a avaliação. O grupo GUV(Cist 3mM)

exibiu menores ($P < 0,05$) concentrações de ROS (0,09 UAF) em comparação ao grupo Cist (0,16 UAF), mas ambos não diferiram do grupo controle (0,10 UAF). As maiores concentrações de ROS foram observadas no grupo MD (0,34 UAF), que diferiu dos demais tratamentos ($P < 0,05$).

Tabela 6. Concentrações intracelulares de espécies reativas de oxigênio (ROS) em embriões bovinos cultivados *in vitro* em meio suplementado com vesículas unilamelares gigantes (GUVs) e cisteína (Cist), e submetidos ao estresse oxidativo induzido pela menadiona.

Grupos	Aditivo do meio de cultivo		Nº embriões	ROS (UAF)
	MD*	Cisteína		
Controle	-	-	21	$0,10 \pm 0,01$ ^{bc}
Cist	-	0,6 mM (diluída)**	29	$0,16 \pm 0,02$ ^b
MD	+	-	9	$0,34 \pm 0,05$ ^a
GUV(Cist 3mM)	-	3 mM (na GUV)***	25	$0,09 \pm 0,01$ ^c

Os dados estão apresentados na forma de média $\pm$ EPM. *Os embriões foram cultivados por 7 dias, sendo que a menadiona (5,0 μ M) foi incluída no meio apenas no sexto dia de cultivo (do D6 ao D7); **No grupo Cist, a cisteína foi diluída diretamente no meio de cultivo na concentração final de 0,6 mM; ***No grupo GUV(Cist 3mM), as GUVs foram eletroformadas com 3 mM de cisteína em seu interior e foram subsequentemente diluídas no meio de cultivo (20% v/v), de forma que a concentração final máxima atingisse 0,6 mM após liberação pelas GUVs. ^{abc}Letras diferentes na mesma coluna diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

7. DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo em que foi proposta a utilização de GUVs como estruturas carreadoras de antioxidante (cisteína) para suplementação do meio de cultivo *in vitro* de embriões bovinos. De maneira geral, os resultados demonstraram que as GUVs não são embriotóxicas e são sensíveis às ROS produzidas pelos

embriões cultivados *in vitro* sob condição geradora de estresse oxidativo. Adicionalmente, a diminuição do conteúdo intracitoplasmático de ROS em embriões cultivados com cisteína encapsulada em GUVs sugere que a inclusão de antioxidante no meio de cultivo via GUVs é mais eficiente no controle do estresse oxidativo do que a suplementação via diluição direta de antioxidante no meio.

No presente estudo não foram observadas alterações do diâmetro de GUVs cultivadas *in vitro* na presença de menadiona. Essa molécula já foi utilizada em estudos anteriores como geradora de estresse oxidativo em células cultivadas *in vitro* (MOSS; PONTES; HANSEN, 2009). Sua ação consiste em gerar ROS em múltiplos locais intracelulares, promovendo desequilíbrio no sistema redox de nucleotídeos de pirimidinas e comprometendo a atividade mitocondrial (CIRCU; MALONEY; AW, 2011). Em consequência, as células produzem as principais ROS, como por exemplo, o ânion superóxido (O_2^-) e o H_2O_2 (MONKS et al., 1992). Embora não tenha sido investigada a presença de ROS no meio de cultivo no presente estudo, a ausência de efeitos da menadiona sobre as GUVs sugere que a ausência de células em co-cultivo não tenha induzido a geração das ROS e que, devido a isso, esta droga não é capaz de induzir o estresse oxidativo diretamente nas GUVs. Desta forma, foi avaliado o efeito direto de um radical livre (H_2O_2), o qual foi capaz de promover a modificação do diâmetro das GUVs cultivadas *in vitro* na ausência de células, semelhante ao descrito por RISKE et al. (2009) ao utilizarem substância fotooxidativa na presença de GUVs.

Tendo sido determinada a sensibilidade das GUVs às ROS, estas estruturas foram co-cultivadas *in vitro* com embriões bovinos em condição de estresse oxidativo induzido pela menadiona, visando avaliar a suscetibilidade das GUVs às ROS produzidas pelas células em cultivo. Observou-se variação no diâmetro e na quantidade de GUVs remanescentes ao final do período de cultivo no grupo tratado com a maior concentração de menadiona avaliada neste estudo (7,5 μM). Este resultado corrobora com o achado acerca da sensibilidade das GUVs ao H_2O_2 e pode ser explicado pelo fato de que as GUVs são estruturas extremamente sensíveis à peroxidação lipídica, decorrente de uma reação em cadeia dos produtos oxidativos (HEUVINGH; BONNEAU, 2009). Estudos recentes demonstraram que a exposição das GUVs à substâncias fotooxidativas ocasiona a clivagem das cadeias lipídicas que levam à abertura de poros na membrana que, conseqüentemente, promove alterações

de sua estrutura (AOKI et al., 2015; GASCHLER; STOCKWELL, 2017; BACELLAR et al., 2018), como aumento da área de superfície das GUVs associado ou não às flutuações nas membranas e liberação das “buds” como consequência do estresse oxidativo (HEUVINGH; BONNEAU, 2009; RISKE et al., 2009; MERTINS et al., 2014). Desta forma, os resultados observados no presente estudo sugerem que a variação do diâmetro das GUVs seja uma resposta de sua sensibilidade ao estresse oxidativo. Embora não tenha sido avaliada a ultraestrutura das GUVs no presente estudo, pode-se sugerir, com base nos relatos de literatura (CAETANO et al., 2007; RISKE et al., 2009; MERTINS et al., 2014; WEBER et al., 2014; AOKI et al., 2015; GASCHLER; STOCKWELL, 2017; BACELLAR et al., 2018), que a variação do diâmetro das GUVs seja uma consequência de lesões na membrana causadas pelas ROS, especialmente pelo radical H_2O_2 , e que tais lesões propiciem o possível extravasamento do conteúdo presente em seu interior.

Desta forma, uma vez que as GUVs são consideradas ótimas ferramentas para encapsular macromoléculas (JIMÉNEZ, et al., 2013), e que os radicais livres são capazes de lesionar a sua membrana (MERTINS et al., 2014), causando possível extravasamento de seu conteúdo, estas estruturas tornam-se excelentes candidatas para serem utilizadas como veículos para liberação gradual de antioxidantes no meio de cultivo *in vitro* de embriões, em resposta às situações geradoras de estresse oxidativo. Neste raciocínio, o fornecimento de antioxidante ao meio, via GUVs, seria uma resposta à necessidade do sistema de cultivo, já que a inclusão desnecessária e excessiva de antioxidantes pode ser prejudicial (ROCHA-FRIGONI et al., 2013), já que as ROS também desempenham papel fisiológico, mais especificamente regulam a função celular ao controlar a produção e a ativação de substâncias que têm atividade biológica nas principais vias de sinalização celular (BUHIMSCHI et al., 2000; MARSHALL; MERCHANT; STAMLER, 2000; BACELLAR et al., 2018).

Todavia, de acordo com os relatos disponíveis na literatura, nenhum estudo anterior utilizou GUVs em co-cultivo de embriões, sendo necessário avaliar inicialmente a sua embriotoxicidade. Os resultados do presente estudo demonstraram que as GUVs não afetaram o desenvolvimento embrionário, portanto não promoveram efeito embriotóxico. Da mesma forma, não foi observado aumento do conteúdo intracelular de ROS em embriões cultivados *in vitro* na presença de GUVs, o que

indica que o maior teor lipídico do ambiente de cultivo, decorrente da composição lipídica da membrana das GUVs, não promoveu por si só um aumento da condição geradora de estresse oxidativo. Com base nestes resultados satisfatórios para sugerir a utilização de GUVs como nanoferramentas (ou, mais apropriadamente, como “microferramentas” – devido ao seu maior tamanho), propusemos a formação destas estruturas com cisteína em seu interior, na expectativa de que as alterações promovidas na membrana destas estruturas pelas ações das ROS produzidas durante o cultivo *in vitro* de embriões pudessem propiciar o possível extravasamento do antioxidante presente em seu interior, sob demanda.

A presença de cisteína no meio de cultivo é fator limitante para a síntese de GSH pelo embrião e trabalhos anteriores demonstraram que a suplementação do meio com cisteína (0,6 mM) durante as primeiras 72 horas de cultivo embrionário melhora a taxa de desenvolvimento de mórulas e blastocistos (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003). Porém, contrariamente aos achados destes autores, no presente estudo a suplementação do meio com cisteína na concentração de 0,6 mM, tanto diluída no meio quanto encapsulada em GUVs, não promoveu aumento nas taxas de produção de blastocistos quando não houve desafio com menadiona, embora tenha sido observado um interessante aumento numérico na produção embrionária [25,58% no grupo controle vs. 31,77% e 30,16% nos grupos Cist e GUV(Cist 3mM), respectivamente]. Da mesma forma, quando não houve geração de estresse oxidativo, ambas as formas de suplementação do meio com cisteína não levaram à diminuição do conteúdo intracitoplasmático de ROS nos embriões em comparação com o controle. De acordo com relatos de literatura, a adição de antioxidantes durante o cultivo *in vitro* produz resultados contraditórios, com alguns estudos relatando nenhum efeito (IWATA et al., 1998) e outros relatando efeitos benéficos (ALI; BILODEAU; SIRARD, 2003) ou, ainda, indesejáveis (VAN SOOM et al., 2002) sobre o desenvolvimento embrionário. Todavia, geralmente os efeitos são benéficos somente quando as condições de cultura são inadequadas (HARVEY, 2007). Portanto, a ausência de efeitos do antioxidante sugere que as condições de cultivo estabelecidas para o presente estudo foram satisfatórias e não geraram estresse oxidativo.

Todavia, quando os embriões foram desafiados com menadiona, a cisteína, seja diretamente diluída no meio (concentração de 0,6 mM) ou fornecida na forma encapsulada no interior das GUVs (na concentração final máxima de 0,6 mM), não foi eficiente para reverter a redução no desenvolvimento embrionário. Este resultado sugere que o antioxidante utilizado foi ineficiente ou, ainda que a condição de estresse oxidativo induzida neste estudo foi muito exacerbada, o que é compatível com o bloqueio do desenvolvimento embrionário observado nesta condição.

Mesmo quando adicionada em maior concentração (concentração final máxima de 25,8 mM), a cisteína não reverteu a redução no desenvolvimento embrionário na condição de estresse oxidativo. Além disso, mesmo na situação padrão (sem desafio com menadiona), foi muito prejudicial e afetou negativamente as taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário. ZHOU et al. (2016) reportaram que o aumento da concentração de cisteína (de 200 μ M a 500 μ M) durante o cultivo de embriões de pequenos ruminantes reduziu o desenvolvimento embrionário devido a um possível desbalanço no sistema redox. Portanto, no presente estudo as altas concentrações de cisteína podem ter promovido uma redução drástica das ROS intracelulares, levando a um desbalanço ou alteração nas vias de sinalização celular que são reguladas pelas ROS em concentrações fisiológicas (BUHIMSCHI et al., 2000; MARSHALL; MERCHANT; STAMLER, 2000; MORADO et al., 2009), o que culminou com o bloqueio total do desenvolvimento embrionário. Estes resultados reforçam o conceito de que o equilíbrio entre as concentrações intracelulares de ROS e os mecanismos antioxidantes é essencial para sustentar o desenvolvimento embrionário (ROCHA-FRIGONI et al., 2013).

Naturalmente, os sistemas de cultivo *in vitro* e manipulação de embriões favorecem a produção das ROS devido a diversos fatores como, por exemplo, a exposição à luz, atmosfera gasosa com altas tensões de oxigênio e a própria composição dos meios (GOTO et al., 1993; GUÉRIN; MOUATASSIM; MÉNÉZO, 2001; CORRÊA et al., 2008; ROCHA-FRIGONI et al., 2013). No presente trabalho, apesar da suplementação do meio com 0,6 mM cisteína ter sido inócua sobre as taxas de desenvolvimento embrionário, os resultados demonstraram que a suplementação com este antioxidante na forma encapsulada em GUVs foi mais eficiente do que a sua diluição direta no meio para impedir a elevação da concentração intracitoplasmática

de ROS nos embriões, decorrentes do estresse oxidativo induzido pelo próprio sistema de cultivo, ou seja, na ausência de menadiona [0,09 UAF no grupo GUV(Cis 3mM) vs. 0,16 UAF no grupo Cist]. Devido ao embasamento teórico, pode-se sugerir que a diluição direta de cisteína no meio de cultivo possa ter resultado em sua rápida oxidação em cistina (MERTON et al., 2013; ZHOU et al., 2016), consequentemente reduzindo sua disponibilidade como precursora da síntese de GSH (TAKAHASHI et al., 1993; MERTON et al., 2013). Por outro lado, a possível liberação lenta da cisteína para o meio, a partir da ruptura das GUVs, pode ter favorecido o fornecimento gradual de cisteína ao meio, disponibilizando-a por um maior período de tempo. Esses resultados são promissores e estimulam a continuidade deste estudo para readequação e ajuste do novo protocolo estabelecido.

8. CONCLUSÕES

Em conclusão, as GUVs cultivadas *in vitro* não promoveram efeito tóxico e nem aumentaram as concentrações intracelulares de ROS nos embriões, sendo seguras para utilização em propósitos de produção *in vitro* de embriões.

O peróxido de hidrogênio foi capaz de promover modificações nas GUVs, características de estresse oxidativo.

Em comparação com sistema em que a cisteína foi diluída diretamente no meio (forma não encapsulada), as GUVs produzidas com cisteína em seu interior foram mais eficientes para prevenir o aumento intracitoplasmático de ROS em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

9. REFERÊNCIAS

- ADHIKARI, D.; LIU, K. The regulation of maturation promoting factor during prophase I arrest and meiotic entry in mammalian oocytes. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 382, p. 480–487, 2014.
- AUFFAN, M.; ROSE, J.; BOTTERO, J.Y.; LOWRY, G.V.; JOLIVET, J.P.; WIESNER, M.R. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. **Nature Nanotechnology**. v.4, , p.634–641, 2009.

ALI, A.A.; BILODEAU, J.F.; SIRARD, M.A. Antioxidant requirements for bovine oocytes varies during *in vitro* maturation, fertilization and development. **Theriogenology**, v.59, p.939-949, 2003.

ALI, I.; SHAH, S.Z.A.; JIN, Y.; LI, ZS.; ULLAH, O.; FANG, NZ. Oxygen species-mediated unfolded protein response pathways in preimplantation embryos. **Journal of Veterinary Science**, v. 18, , p.1–9 2017.

AOKI, P.H.B.; SCHRODER, A.P.; CONSTANTINO, C.J.L.; MARQUES, C.M. Bioadhesive giant vesicles for monitoring hydroperoxidation in lipid membrane. **Soft Matter**, v.11, p.5995-5998, 2015.

AROUSH, D.R.B.; YEHUDAI-RESHEFF, S.; KEREN, K. Electrofusion of giant unilamellar vesicles to cells. **Methods in Cell Biology**, v.125, p.409-422, 2015.

BACELLAR, I.O.L.; BAPTISTA, M.S.; JUNQUEIRA, H.C.; WAINWRIGHT, M.; THALMANN, F.; MARQUES, C.M.; SCHRODER, A.P. Permeability of DOPC bilayers under photoinduced oxidation: Sensitivity to Photosensitizer . **BBA – Biomembranes**, v.1860, p.2366–2373, 2018.

BANNAI, S. Transport of cystine and cysteine in mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)**, v.779, , p.289-306, 1984.

BASINI G.; SIMONA B.; SUJEN E.S.; GRASSELLI F. Reactive oxygen species and anti-oxidant defences in swine follicular fluids. **Reproduction, Fertility and Development**, v.20, p.269–274, 2008.

BUHIMSCHI, I.A.; KRAMER, W.B.; BUHIMSCHI, C.S.; THOMPSON, L.P.; WEINER, C.P. Reduction-oxidation (redox) state regulation of matrix metalloproteinase activity in human fetal membranes. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v.182, p.458-464, 2000.

BHATIA, T.; HUSEN, P.; BREWER, J.; BAGATOLLI, L.A.; HANSEN, P.L.; IPSEN, J.H.; MOURITSEN, O.G. Preparing giant unilamellar vesicles (GUVs) of complex lipidmixtures on demand: Mixing small unilamellar vesicles of compositionally heterogeneous mixtures. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1848, p.3175–3180, 2015.

BRESCIANI, G.; DA CRUZ, I.B.M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation. **Advances in Clinical Chemistry**, v.68, p.87-130,2015.

CAETANO, W.; HADDAD, P.S.; ITRI, R.; SEVERINO, D.; VIEIRA, V.C.; BAPTISTA, M.S.; SCHRODER, A.P.; MARQUES ,C.M. Photo-Induced Destruction of Giant Vesicles in Methylene Blue Solutions. **Langmuir**, v.23, , p.1307–1314, 2007.

CALABRESE, G.; MORGAN, B.; RIEMER, J. Mitochondrial Glutathione: Regulation and Functions. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.27, , 2017.

CIRCU, M.L.; MALONEY, R.E.; AW, T.Y. Disruption of Pyridine Nucleotide Redox Status During Oxidative Challenge at Normal and Low-Glucose States: Implications for Cellular Adenosine Triphosphate, Mitochondrial Respiratory Activity, and Reducing Capacity in Colon Epithelial Cells. **Antioxidants & Redox Signaling**, v.14, p.2151-2162, 2011.

CORRÊA, G.A.; RUMPFA, R.; MUNDIM, T.C.D.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Oxygen tension during *in vitro* culture of bovine embryos: Effect in production and expression of genes related to oxidative stress. **Animal Reproduction Science**, v.104, p.132–142, 2008.

DEKEL, N.; ABERDAM, E.; SHERIZLY, I. Spontaneous maturation in vitro of cumulus-enclosed rat oocytes is inhibited by forskolin. **Biology of Reproduction**, v. 31, p.244–250, 1984.

DELEUZE, S.; GOUDET, G. Cysteamine supplementation of *in vitro* maturation media: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.476-482, 2010.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F.; MARTINEZ, A.G.; MATKOVIC, M. Stimulation of glutathione synthesis of *in vitro* matured bovine oocytes and its effect on embryo development and freezability. **Molecular Reproduction and Development**, v.45, p.451-457, 1996.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C.; MOSES, D.F. Glutathione synthesis during *in vitro* maturation of bovine oocytes: role of *cumulus* cells. **Biology of Reproduction**, v.57, p.1420-1425, 1997.

DE MATOS, D.G.; FURNUS, C.C. The importance of having high glutathione (GSH) level after bovine *in vitro* maturation development: effect of p-mercaptoethanol, cysteine and cysteine. **Theriogenology**, v.53, p.761-771, 2000.

DIMOVA, R. Giant Vesicles: A Biomimetic Tool for Membran Characterization. **Advances in Planar Lipid Bilayers and Liposomes**, v.16, p.1-50, 2012.

DOWLING, D.K.; SIMMONS, L.W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v.276, p.1737–1745, 2009.

EDRY, I.; SELA-ABRAMOVICH, S.; DEKEL, N. Meiotic arrest of oocytes depends on cell-to-cell communication in the ovarian follicle. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 252, p.102–106, 2006.

FEUGANG, J.M.; VAN LANGENDONCKT, A.; SAYOUD, H.; REES, J.F.; PAMPFER, S.; MOENS, A.; et al. Effect of prooxidant agents added at the morula/blastocyst stage on bovine embryo development, cell death and glutathione content. **Zygote**, v.11, p.107-125, 2003.

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

FRANCIOSI, F.; COTICCHIO, G.; LODDE, V.; TESSARO, I.; MODINA, S. C.; FADINI, R.; DAL CANTO, M.; RENZINI, M. M.; ALBERTINI, D. F.; LUCIANO, A. M. Natriuretic Peptide Precursor C delays meiotic resumption and sustains gap junction-mediated communication in bovine cumulus-enclosed oocytes. **Biology Reproduction**, v. 9, , p.1-9, 2014.

GASCHLER, M.M.; STOCKWELL, B.R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.482, p.419–425, 2017.

GOTO, K.; NODA, Y.; MORI, T.; NAKANO, M. Increased generation of reative oxygen species in embryos cultured *in vitro*. **Free Radical Biology & Medicine**, v.5, p.65-79, 1993.

GUÉRIN P.; MOUATASSIM, S.E.L.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reative oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. **Human Reproduction Update**, v.7, p.175-189, 2001.

GUIMARÃES, A.L.S.; PEREIRA, S.A.; LEME, L.O.; DODE, M.A.N. Evaluation of the simulated physiological oocyte maturation system for improving bovine in vitro embryo production. **Theriogenology**, v.83, p. 52–57, 2015.

HARVEY, A.J. The role of oxygen in ruminant preimplantation embryo development and metabolism. **Animal Reproduction Science**, v.98, p.113–128, 2007.

HEUVINGH, J.; BONNEAU, S. Asymmetric Oxidation of Giant Vesicles Triggers Curvature-Associated Shape Transition and Permeabilization. **Biophysical Journal**, v.97, p.2904–2912, 2009.

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

ITRI, R.; JUNQUEIRA, H.C.; MERTINS, O.; BAPTISTA, M.S. Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids. **Biophysical Reviews**, v.6, p.47–61, 2014.

IWATA, H.; AKAMATSU, S.; MINAMI, N. et al. Effect of antioxidants on development of bovine IVM/IVF embryos in various concentration of glucose. **Theriogenology**, v.50, p.365-375, 1998.

JIMÉNEZ, M.; MARTOS, A.; CABRÉ, E.J.; RASO, A.; RIVAS, G. Giant vesicles: a powerful tool to reconstruct bacterial division assemblies in cell-like compartments. **Environmental Microbiology**, v.15, p.3158–3168, 2013.

JOHNSON, M.H.; NARS-ESFAHANI, M.H. Radical solutions and cultural problems: could free oxygen radicals be responsible for the impaired development of preimplantation mammalian embryos *in vitro*?. **Bioessays**, v.16, p.31-39, 1994.

JONES, K. T. Turning it on and off: M-phase promoting factor during meiotic maturation and fertilization. **Molecular Human Reproduction**, v.10, p. 1-5, 2004.

KIM, B.Y.S.; RUTKA, J.T.; CHAN, W.C.W. Nanomedicine. **The New England Journal of Medicine**, v.363, p.2434-2443, 2010.

KUSSANO, N.R.; LEME, L.O.; GUIMARÃES, A.L.S.; FRANCO, M.M.; DODE, M.A.N. Molecular markers for oocyte competence in bovine cumulus cells. **Theriogenology**, v. 85, p.1167–1176, 2016.

LASIC, D.D. The mechanism of vesicle formation. **Biochemical Journal**, v.256, p.1-11, 1988.

LIU, X.C.; DU, H.H.; FU, L.M.; HAN, R.M.; WANG, P.; AI, X.C.; ZHANG, J.P.; SKIBSTED, L.H. Integrity of Membrane Structures in Giant Unilamellar Vesicles As Assay for Antioxidants And Prooxidants. **Analytical Chemistry**, v.90, p.32126-2133, 2018.

LOPES, A.S.; LANE, M.; THOMPSON, J.G. Oxygen consumption and ROS production are increased at the time of fertilization and cell cleavage in bovine zygotes. **Human Reproduction**, v.25, n.11 p. 2762–2773, 2010.

LUSHCHAK, V.I. Classification of oxidative stress based on its intensity. **EXCLI Journal**, v.13, p.922-937, 2014.

MARSHALL, H.E.; MERCHANT, K.; STAMLER, J.S. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB Journal**, v.14, p.1889-1900,2000.

MERTINS, O.; BACELLAR, I.O.L.; THALMANN, F.; MARQUES, C.M.; BAPTISTA, M.S.; ITRI, R. Physical Damage on Giant Vesicles Membrane as a Result of Methylene Blue Photoirradiation. **Biophysical Journal**, v.106, p.162–171, 2014.

MERTON, J.S.; KNIJN, H.M.; FLAPPER, H.; DOTINGA, F.; ROELEN, B.A.J.; VOS, P.L.A.M.; MULLAART, E. Cysteamine supplementation during *in vitro* maturation of slaughterhouse and opu-derived bovine oocytes improves embryonic development without affecting cryotolerance, pregnancy rate, and calf characteristics. **Theriogenology**, v.80, p.365–371, 2013.

MONKS, T.J.; HANZLIK, R.P.; COHEN, G.M.; ROSS, D.; GRAHAM, D.G. Quinone chemistry and toxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.112, p.2-16, 1992.

MORADO, S.A.; CETICA, P.D.; BECONI, M.T.; DALVIT, G.C. Reactive oxygen species in bovine oocyte maturation *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, v.21, p.608-614, 2009.

MOSS, J.I.; PONTES, E.; HANSEN, P.J. Insulin-like growth factor-1 protects preimplantation embryos from anti-developmental actions of menadione. **Archives of Toxicology**, v.83, p.1001–1007, 2009.

PICTON, H.; BRIGGS, D.; GOSDEN, R. The molecular basis of oocyte growth and development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 145 , p.27–37, 1998.

RATHBUN, W. B.; MURRAY, D. L. Age-related cysteine uptake as rate-limiting in glutathione synthesis and glutathione half-life in the cultured human lens. **Experimental Eye Research**, v.53, p.205–212, 1991.

RILEY P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v.65, p.27–33, 1994.

RISKE, K.A.; SUDBRACK, T.P.; ARCHILHA, N.L.; UCHOA, A.F.; SCHRODER, A.P.; MARQUES, C.M.; BAPTISTA, M.S.; ITRI, R. Giant Vesicles under Oxidative Stress Induced by a Membrane-Anchored Photosensitizer. **Biophysical Journal**, v.97, p.1362–1370, 2009.

RIZOS D.; WARD F.; DUFFY P.; BOLAND M.P.; LONERGAN P. Consequences of Bovine Oocyte Maturation, Fertilization or Early Embryo Development In Vitro Versus In Vivo: Implications for Blastocyst Yield and Blastocyst Quality. **Molecular Reproduction and Development**, v.61, p.234–248, 2002.

ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.S.; NOGUEIRA, É.; ACCORSI, M.F.; MINGOTI, G.Z. Effects of gaseous atmosphere and antioxidants on the development and cryotolerance of bovine embryos at different periods of *in vitro* culture. **Zygote**, v.23, p.159–168, 2013.

ROCHA-FRIGONI, N.A.S.; LEÃO, B.C.; NOGUEIRA, É.; ACCORSI, M.F.; MINGOTI, G.Z. Reduced levels of intracellular reactive oxygen species and apoptotic status are not correlated with increases in cryotolerance of bovine embryos produced *in vitro* in the presence of antioxidants. **Reproduction, Fertility and Development**, v.26, p.797–805, 2014.

RUNAS, K.A.; MALMSTADT, N. Low levels of lipid oxidation radically increase the passive permeability of lipid bilayers. **Soft Matter**, v.11, p.499–505, 2015.

SAGARA, J.; MIURA, K.; BANNAI, S. Cystine uptake and glutathione level in fetal brain cells in primary culture and suspension. **Journal of Neurochemistry**, v.61, p.1667–11671, 1993.

SANDERSON J. Resolving the kinetics of lipid, protein and peptide diffusion in membranes. **Molecular Membrane Biology**, v.29, p.118–143, 2012.

SOVERNIGO, T.C.; ADONA, P.R.; MONZANI, P.S.; GUEMRA, S.; BARROS, F.D.A.; LOPES, F.G.; LEAL, C.L.V. Effects of supplementation of medium with different antioxidants during *in vitro* maturation of bovine oocytes on subsequent embryo production. **Reproduction in Domestic Animals**, p.1–9, 2017.

SUMIMOTO, H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. **The FEBS Journal**, v.275, n.13, p.3249-77, 2008.

TAKAHASHI, M.; NAGAI, T.; HMANAO, S.; KUWAYAMA, M.; OKAMURA, N.; OKANO, A. Effect of thiol compounds on *in vitro* development and intracellular glutathione content of bovine embryos. **Biology of Reproduction**, v.49, p.228-232, 1993.

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

TAMURA, H.; TAKASAKI, A.; TAKETANI, T.; TANABE, M.; KIZUKA, F.; LEE, L.; TAMURA, I.; MAEKAWA, R.; AASADA, H.; YAMAGATA, Y.; SUGINO, N. The role of melatonin as an antioxidant in the follicle. **Journal of Ovarian Research**, v.5, p.1-9, 2012.

TRAN, V.V.; MOON, J.Y.; LEE, Y.C. Liposomes for delivery of antioxidants in cosmeceuticals: Challenges and development strategies. **Journal of Controlled Release**, v.300, p.114-140, 2019.

VAN SOOM, A.; YUAN, Y.Q.; PEELMAN, L.J.; DE MATOS, D.G.; DEWULF, J.; LAESENS, H.; DE KRUIF, A. Prevalence of apoptosis and inner cell allocation in bovine embryos cultured under different oxygen tensions with or without cysteine addition. **Theriogenology**, v.57, p.1453–1465, 2002.

WALDE, P.; ICHIKAWA, S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. **Biomolecular Engineering**, v.18, p.143–177, 2001.

WALDE, P.; COSENTINO, K.; ENGEL, H.; STANO, P. Giant Vesicles: Preparations and Applications. **Chem Bio Chem**, v.11, p.848 – 865, 2010.

WANG F, TIAN XZ, ZHANG L, GAO C, HE CJ, FU Y, JI PY, LI Y, LI N, LIU GS. Beneficial effects of melatonin on in vitro bovine embryonic development are mediated by melatonin receptor 1. **Journal of Pineal Research**, v.56, p.333–342, 2014.

WATKINS, R.; LING, W.; ZHANG, C.; DAVIS, R.M.; XU, B. Natural product-based nanomedicine: recent advances and issues. **International Journal of Nanomedicine**, v.10, p.6055–6074, 2015.

WEBER, G.; CHARITAT, T.; BAPTISTA, M.S.; UCHOA, A.F.; PAVANI, C.; JUNQUEIRA, H.C.; GUO, Y.; BAULIN, V.A.; ITRI, R.; MARQUES, C.M.; SCHRODER, A.P. Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes. **Soft Matter**, v.10, n.24, p.4241–4247, 2014.

WESOŁOWSKA, O.; MICHALAK, K.; MANIEWSKA, J.; HENDRICH, A.B. Giant unilamellar vesicles - a perfect tool to visualize phase separation and lipid rafts in model systems. **Acta Biochimica Polonica**, v.56, n.1, p.33-39, 2009.

WU B.; ZAN L. Enhance beef cattle improvement by embryo biotechnologies. **Reproduction Domestic Animal**, v.4, p.865–871, 2012.

ZHAO, Y.; HU X.; LIU, Y.; DONG, S.; WEN, Z.; HE, W.; ZHANG, S.; HUANG, Q.; SHI, M. ROS signaling under metabolic stress: cross-talk between AMPK and AKT pathway. **Molecular Cancer**, v.16, p.1-12, 2017.

ZHOU, Z.; JIA, R.X.; ZHANGG.; WAN, J.; ZHANG, Y.; FAN, Y.; WANG, Z.; HUANG, P.; WANG, F. Using cysteine/cystine to overcome oxidative stress in goat oocytes and embryos cultured *in vitro*. **Molecular Medicine Reports**, v.14, p.1219-1226, 2016.