

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 05/07/2021.

**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

2019

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
COORIENTADOR: MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA
COORIENTADOR: 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 Tamillis 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



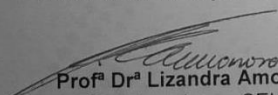
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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%; Cyst: 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 glutathiona (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.

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.

GASCHLERA, 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: oxidatives 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.; LAEVENS, 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.