



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102020025567-3 A2



(22) Data do Depósito: 14/12/2020

(43) Data da Publicação Nacional: 28/06/2022

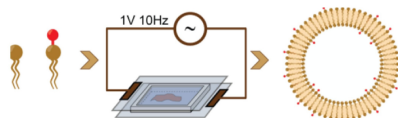
(54) Título: MÉTODO PARA ENCAPSULAMENTO DE ANTIOXIDANTES DENTRO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES COMO CARREGADORAS DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS

(51) Int. Cl.: A61K 9/133.

(71) Depositante(es): UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) Inventor(es): GISELE ZOCCAL MINGOTI; MARCELO FÁBIO GOUVEIA NOGUEIRA; PEDRO HENRIQUE BENITES AOKI; LUANA TEIXEIRA RODRIGUES ROSSI.

(57) Resumo: MÉTODO PARA ENCAPSULAMENTO DE ANTIOXIDANTES DENTRO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES COMO CARREGADORAS DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS. Dito método para encapsulamento de antioxidantes acrescenta as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - contendo antioxidantes em sistemas de cultivo in vitro de gametas ou embriões de mamíferos, para a liberação dos antioxidantes para combater o estresse oxidativo característico do ambiente de cultivo in vitro.



“MÉTODO PARA ENCAPSULAMENTO DE ANTIOXIDANTES DENTRO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES COMO CARREGADORAS DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS”.

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

[001] A presente patente de invenção trata de método para encapsulamento de antioxidantes dentro de vesículas unilamelares gigantes ou ‘*Giant Unilamellar Vesicle*’ - GUV - como carregadoras de antioxidantes em sistemas de produção *in vitro* de embriões de mamíferos. O propósito da invenção é acrescentar as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - contendo antioxidantes em sistemas de cultivo *in vitro* de gametas ou embriões de mamíferos, visando a liberação dos antioxidantes para combater o estresse oxidativo característico do ambiente de cultivo *in vitro*.

[002] A tecnologia pode ser aplicada sem restrições em sistemas de cultivo *in vitro* de qualquer tipo de célula, uma vez que, não tem em sua composição produtos de origem animal ou biológico, assim como, de gametas e embriões de qualquer espécie de mamífero (humano e animal).

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

[003] Antioxidantes do tipo 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, 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 (H₂O₂) (JOHNSON; NASR- ESFAHANI, 1994). Todavia, a cisteína é instável fora da célula e é rapidamente oxidada 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.

[004] O artigo denominado como Papel dos antioxidantes no cultivo *in vitro* de células

ovarianas - Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.35, n.3, p.315-326, jul./set. 2011 revela que os radicais livres são moléculas que contêm elétrons desemparelhados na camada de valência atuando na defesa do organismo contra agentes estranhos, podendo ser importantes marcadores da remodelação dos tecidos. Entretanto, um desequilíbrio entre sua produção e neutralização pode levar a danos celulares, denominados estresse oxidativo. Os agentes neutralizantes dessas moléculas são conhecidos como antioxidantes e podem ser de natureza enzimática ou não. Tendo em vista que o metabolismo oxidativo é essencial para a produção de energia em gametas e embriões, a produção de radicais livres é inevitável. Alguns agentes antioxidantes têm sido adicionados aos meios de cultivo de células ovarianas a fim de reduzir o estresse oxidativo. Sendo assim, a presente revisão objetiva descrever os principais antioxidantes e suas funções em compartimentos celulares com ênfase nas células ovarianas.

[005] O artigo intitulado como Produção in vitro (PIV) de embriões em bovinos - Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.40, n.2, p.58-64, abr./jun. 2016 revela que a produção in vitro de embriões (PIV) é uma biotécnica importante para exploração do potencial genético de fêmeas bovinas e tem sido utilizada em escala comercial no Brasil e no mundo. A PIV envolve as etapas de coleta, maturação, fecundação e cultivo in vitro sendo que a eficiência das etapas de maturação e fecundação *in vitro* não difere daquela obtida in vivo. No entanto, o cultivo in vitro continua sendo a etapa que apresenta a menor eficiência sendo que, em média, apenas 30% dos oócitos maturados in vitro se desenvolvem ao estágio de blastocisto. Adicionalmente, os blastocistos produzidos in vitro diferem daqueles produzidos in vivo, apresentando menores taxas de prenhez e sendo menos tolerantes à criopreservação. Portanto, o objetivo desta revisão é realizar uma abordagem atualizada das principais etapas da produção in vitro de embriões bovinos.

PESQUISA

[006] As vesículas unilamelares gigantes ou '*Giant Unilamellar Vesicle*' - GUVs são estruturas denominadas como 'vesículas lipídicas' e foram desenvolvidas buscando obter modelos que mimetizam membranas biológicas. Essas estruturas são compartimentos esféricos constituídos por uma ou mais camadas de moléculas lipídicas,

podendo ser 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). Estas estruturas tem sido recentemente avaliadas como potenciais nanoferramentas, visando o controle da liberação de drogas encapsuladas em seu interior (WATKINS et al., 2015) e são particularmente interessantes para serem empregadas como carreadoras de macromoléculas biológicas. Adicionalmente, as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - têm um interessante potencial para serem utilizadas como marcadoras do estresse oxidativo durante o cultivo *in vitro*, pois a sua composição fosfolipídica as torna extremamente sensíveis à ação das ROS, culminando em peroxidação lipídica (ITRI et al., 2014). Quando submetidas ao estresse oxidativo, há interação dos radicais livres com as duplas ligações dos fosfolipídios presentes nas membranas das vesículas unilamelares gigantes - GUVs - o que causa hidroperoxidação lipídica que, conseqüentemente, leva ao aumento da área associado ou não às flutuações nas membranas e abertura de poros nas membranas (AOKI et al., 2015).

[007] Desta forma, verifica-se que as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - podem ser aplicadas como ferramentas para englobar antioxidantes e serem co-cultivadas *in vitro* com embriões bovinos para atuarem como doadoras de antioxidantes (cisteína) ao meio de cultivo em condição de estresse oxidativo. Desta forma, foram conduzidos uma série de experimentos com o objetivo de investigar o comportamento das vesículas unilamelares gigantes - GUVs co-cultivadas *in vitro* com embriões bovinos, sua embriotoxicidade e a sua efetividade como carreadora de um antioxidante (cisteína) no meio de cultivo de embriões em situação de estresse oxidativo.

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

[008] A menadiona - MD - é uma substância utilizada na indução de estresse oxidativo pela capacidade de produzir radicais livres [como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2)] 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 vesículas unilamelares gigantes - GUVs, por sua vez, são estruturas sensíveis ao estresse oxidativo, o qual induz modificações estruturais sobre as mesmas e causa, principalmente, alterações em seu diâmetro (AOK et al, 2015). Desta forma, a variação no diâmetro das vesículas unilamelares gigantes - GUVs - foi utilizada como parâmetro para avaliar a geração de estresse oxidativo induzido de forma indireta no sistema de cultivo pela menadiona.

[009] Para tanto, vesículas unilamelares gigantes - GUVs - tradicionais foram eletroformadas e então diluídas em meio de cultivo embrionário (mSOF) numa proporção de 20% (v/v). Desta solução, 500 µL 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 1,0 mM, 2,5 mM, 5,0 mM, 7,5 mM e 10 mM de menadiona, respectivamente. As placas contendo as vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - GUVs - (em µM) foi mensurado antes do cultivo (D0) e novamente ao término do cultivo (após 72 horas - D3). Este período de 72 horas foi determinado porque conhecer o comportamento das vesículas unilamelares gigantes - GUVs - é particularmente importante neste período, já que as primeiras 72 horas são o momento em que os embriões são mais suscetíveis aos efeitos deletérios das ROS.

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

[010] 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 vesículas unilamelares gigantes - GUVs.

[011] As vesículas unilamelares gigantes - GUVs - tradicionais foram eletroformadas e

diluídas em mSOF (20% v/v), assim como descrito para o estudo I. Desta solução, 500 µL 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 vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - GUVs - foi mensurado no D0 e novamente no D3, da mesma forma como descrito para o estudo I.

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

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

[013] Oócitos bovinos foram maturados e fecundados *in vitro*. O dia da fecundação foi definido como sendo o dia zero de cultivo embrionário (D0). Prováveis zigotos produzidos *in vitro* foram removidos das gotas de fertilização no D1, lavados e transferidos para placas de poços em volume de 500 µL 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 vesículas unilamelares gigantes - GUVs tradicionais; 3) grupo GUV+MD 5,0 µM (n = 104): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de vesículas unilamelares gigantes - GUVs tradicionais e suplementado com 5,0 µM menadiona do D6 ao D7; e 4) grupo GUV+MD 7,5 µM (n = 100): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de vesículas

unilamelares gigantes - GUVs - tradicionais e suplementado com 7,5 μ M menadiona do D6 ao D7 (MOSS; PONTES; HANSEN, 2009).

[014] 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 vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - GUVs - presentes no primeiro dia (D1).

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

[015] Este experimento teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização de vesículas unilamelares gigantes - 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 (ROCHA-FRIGONI et al., 2014) com o efeito da cisteína encapsulada em vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - GUVs. Apesar desta concentração final ser muito superior à preconizada (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 vesículas unilamelares gigantes - GUVs, levando à sua desestabilização.

[016] Prováveis zigotos foram cultivados em placas de poços em volume de 500 µL 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 µM 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 µM 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 µM menadiona a partir do D6; 7) GUV(Cist 129 mM) (n = 112): embriões cultivados em meio mSOF acrescido de 20% (v/v) de vesículas unilamelares gigantes - 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 µM menadiona a partir do D6.

[017] 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 inclusa nas vesículas unilamelares gigantes -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.

OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[018] A geração do estresse oxidativo é um fenômeno que pode ser rapidamente instalado em sistemas de cultivo *in vitro* de gametas e embriões de mamíferos, o que se deve às altas concentrações de oxigênio atmosférico e prolongada incidência de luz durante a manipulação destas estruturas. O estresse oxidativo culmina com a formação de radicais livres (ROS) pelas células, o que pode ocasionar redução do desenvolvimento e da qualidade dos gametas e dos embriões produzidos. Visando para combater o estresse oxidativo característico do ambiente de cultivo *in vitro*, é usual o acréscimo de antioxidantes aos meios de cultivo, como por exemplo a cisteína. Todavia, a cisteína é instável fora da célula e é rapidamente oxidada após a preparação e equilíbrio do meio em uma incubadora, sabendo-se que apenas 3% de uma concentração inicial de 0,6 mM de cisteína no meio de cultivo permanece após 24 horas de incubação (DE MATOS; FURNUS; MOSES, 1996). Desta forma, o método ora inovado apresenta uma forma de encapsulamento deste antioxidante em vesículas unilamelares gigantes - GUVs, as quais podem ser aplicadas como ferramentas para atuarem como doadoras de antioxidantes (cisteína) ao meio de cultivo em condição de estresse oxidativo, mantendo o fornecimento de cisteína no meio por tempo mais prolongado.

[019] É objetivo da patente apresentar um método para encapsulamento de antioxidantes dentro de vesículas unilamelares gigantes ou '*Giant Unilamellar Vesicle*' - GUV - que fornece, de maneira gradual, antioxidantes em situações geradoras de estresse oxidativo.

[020] É objetivo da patente apresentar um método para encapsulamento de antioxidantes dentro de vesículas unilamelares gigantes - GUV - que não tem em sua composição produtos de origem animal ou biológico, de forma que pode ser aplicada em restrições em sistemas de cultivo *in vitro* de qualquer tipo de célula, assim como de gametas e embriões de qualquer espécie de mamífero (humano e animal).

[021] É objetivo da patente apresentar um método para encapsulamento de antioxidantes dentro de vesículas unilamelares gigantes - GUV - que beneficia a produção animal, mais especificamente melhorar os índices da produção de embriões bovinos *in vitro*, aumentando o número de nascimentos de bezerros para produção de proteína animal (carne) para alimentação humana.

[022] É objetivo da patente apresentar um método para encapsulamento de antioxidantes dentro de vesículas unilamelares gigantes - GUV - que pode ser utilizado em sistemas de cultivo embrionário *in vitro* na espécie humana, com potencial para melhorar o sistema de cultivo e, conseqüentemente, a qualidade dos embriões gerados.

DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[023] A complementar a presente descrição de modo a obter uma melhor compreensão das características do presente invento e de acordo com uma preferencial realização prática do mesmo, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de desenhos, onde, de maneira exemplificada, embora não limitativa, se representou seu funcionamento:

[024] a figura 1 mostra a representação esquemática da eletroformação das GUVs;

[025] a figura 2 mostra um gráfico das 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 ($P < 0,05$); e

[026] a figura 3 representa um gráfico da 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 ($P > 0,05$).

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[027] A presente patente de invenção se refere à “MÉTODO PARA ENCAPSULAMENTO DE ANTIOXIDANTES DENTRO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES COMO CARREGADORAS DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS”.

[028] Segundo a presente invenção, dito método para encapsulamento de antioxidantes acrescenta as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - contendo antioxidantes em sistemas de cultivo *in vitro* de gametas ou embriões de mamíferos, para a liberação dos antioxidantes para combater o estresse oxidativo característico do ambiente de cultivo *in vitro*. Dito método é compreendido pelas etapas:

- i) Preparação de uma solução estoque do fosfolipídio 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina em clorofórmio, na concentração de 10^{-3} mol/L. É adicionado 0,5 mol% de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) à solução de DOPC para a marcação da membrana com fluorocromo, visando sua posterior observação em microscopia de fluorescência;
- ii) Em seguida, essa solução é espalhada em uma lâmina de vidro recoberta com óxido de estanho dopado com índio/*Indium Tin Oxide* - ITO, sendo então seca em estufa para cultura bacteriológica a 60 °C por 1 hora. Na sequência, uma segunda lâmina de vidro é colocada por cima da lâmina previamente mencionada, utilizando-se um espaçador de teflon entre ambas com o intuito de formar uma "câmara" de incubação. A câmara é então preenchida com a solução de eletroformação, constituída por: (1) sacarose a 0,26 mol/L para proceder à eletroformação de vesículas unilamelares gigantes - GUVs tradicionais; ou (2) sacarose a 0,26 mol/L e 3×10^{-3} mol/L de cisteína para proceder à eletroformação de vesículas unilamelares gigantes - GUVs preenchidas com cisteína [GUV(Cist 3mM)]; ou (3) sacarose a 0,26 mol/L e 129×10^{-3} mol/L de cisteína para proceder à eletroformação de vesículas unilamelares gigantes - GUVs preenchidas com cisteína [GUV(Cist 129mM)]; a concentração de sacarose utilizada para a formulação da solução de eletroformação é determinada para ser iso-osmótica ao meio de cultivo de embriões *in vitro* (meio mSOF), cuja osmolaridade (260 mOsm kg⁻¹) é determinada em um osmômetro (Osmomat 3000); tanto a sacarose quanto a cisteína foram previamente diluídas em água ultrapura (Milli-Q);
- iii) Finalmente, uma tensão AC de 2,0 V a uma frequência fixa de 10 Hz é aplicada através da câmara por no mínimo 3 horas. Uma representação esquemática da estrutura utilizada para eletroformação pode ser visualizada na Figura 1;
- iv) Posteriormente, a solução contendo as vesículas unilamelares gigantes - GUVs -

é removida da câmara com auxílio de uma seringa (3 mL) e armazenada a 4°C por até uma semana. As avaliações das vesículas unilamelares gigantes - GUVs são realizadas em microscópio invertido equipado com fluorescência, 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) são posteriormente avaliadas com auxílio do programa Image J, utilizando-se de uma reta para mensurar o tamanho das vesículas unilamelares gigantes - GUV (de uma extremidade a outra) e assim determinar o seu diâmetro.

- Produção *in vitro* de embriões

[029] As etapas de obtenção dos complexos cumulus-oócito (provenientes de ovários bovinos obtidos em abatedouro comercial), a maturação *in vitro*, a fertilização *in vitro* e o cultivo *in vitro* são realizadas com base em protocolo já publicado e bem conhecido, isto é, o “grupo controle” de diversas publicações do nosso grupo de pesquisa [por exemplo: GF Rossi, EAR Dias, NM Bastos, DP Vrisman, NN Rodrigues, R Vantini, et al. (2019). *Sexual maturity and fertility-related measures in young Nellore bulls receiving long-term dietary supplementation with rumen-protected polyunsaturated fatty acids. Theriogenology* 139, 16-27; e P Chediek Dall’Acqua, G Barros Nunes, C Rodrigues da Silva, PK Fontes, et al. (2019). *Differences in embryonic gene expression and quality indicate the benefit of epidermal growth factor receptor inhibitor during prematuration to improve competence in bovine oocytes. Reproduction in Domestic Animals* 54 (4), 666-677].

- Avaliação da sensibilidade das vesículas unilamelares gigantes - GUVs - ao estresse oxidativo

[030] A composição fosfolipídica das vesículas unilamelares gigantes - GUVs - as torna extremamente sensíveis à ação das ROS, os quais interagem com as duplas ligações dos fosfolipídios presentes em suas membranas, causando hidroperoxidação lipídica e, conseqüentemente, leva ao aumento da área associado ou não às flutuações nas membranas e abertura de poros nas membranas. Desta forma, a variação no diâmetro das vesículas unilamelares gigantes - GUVs - foi utilizada como parâmetro para avaliar a geração de estresse oxidativo no sistema de cultivo induzido de forma indireta (estímulo

pela menadiona) e direta (induzido pelo radical livre peróxido de hidrogênio – H_2O_2).

[031] Os resultados do efeito da menadiona sobre a variação do diâmetro em vesículas unilamelares gigantes - GUVs - cultivadas *in vitro* 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).

[032] Com relação ao efeito do H_2O_2 sobre o diâmetro de vesículas unilamelares gigantes - GUVs, não foi observada diferença entre os 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 vesículas unilamelares gigantes - 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)].

[033] A ausência de efeitos da menadiona sobre as vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - 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 vesículas unilamelares gigantes - GUVs - cultivadas *in vitro* na ausência de células.

[034] 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 ($P>0,05$).

[035] 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 0,01 mM	383	16,64 $\pm$ 0,25	304	19,16 $\pm$ 0,35 ^a
H_2O_2 0,05 mM	353	16,27 $\pm$ 0,25	331	17,90 $\pm$ 0,32 ^{bc}
H_2O_2 0,1 mM	308	16,21 $\pm$ 0,28	268	17,71 $\pm$ 0,30 ^c
H_2O_2 0,5 mM	442	16,30 $\pm$ 0,23	283	17,32 $\pm$ 0,29 ^c
H_2O_2 1,0 mM	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 ($P<0,05$).

- Avaliação da embriotoxicidade e da variação do diâmetro das vesículas unilamelares gigantes - GUVs ao término do cultivo *in vitro*.

[036] Este experimento foi desenvolvido com o objetivo de avaliar: (1) a embriotoxicidade das vesículas unilamelares gigantes - GUVs; (2) as concentrações intracitoplasmáticas de ROS em embriões co-cultivados com vesículas unilamelares gigantes - GUVs; e (3) o comportamento das vesículas unilamelares gigantes - GUVs - (morfometria e quantidade) quando co-cultivadas com embriões submetidos ao estresse oxidativo induzido pela menadiona. Neste experimento foi utilizada a menadiona, pois as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - foram co-cultivadas com os embriões, esperando-se, portanto, que a indução de estresse oxidativo da menodiana sobre as células embrionárias seja capaz de afetar as vesículas unilamelares gigantes - GUVs.

[037] Não foi observada diferença entre os tratamentos ($P>0,05$) com relação à taxa de clivagem (86,35% a 92,95%) e às taxas de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto entre o grupo controle (26,70%) e o grupo GUV (25,18%), indicando que as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - não são embriotóxicas. Todavia, os tratamentos controle e GUV diferiram ($P<0,05$) dos grupos cultivados com o indutor de

estresse oxidativo menadiona [GUV+MD 5,0 μ M (6,95%) e GUV+MD 7,5 μ M (0,95%)], como demonstrado na Tabela 3.

[038] As maiores concentrações intracelulares de ROS (Figura 2) em embriões bovinos (expressas em unidades arbitrárias de fluorescência – UAF) foram observadas no grupo GUV+MD 5,0 μ M (16,28), o qual diferiu ($P < 0,05$) dos grupos controle (3,76) e GUV (3,99). Embriões do grupo GUV+MD 7,5 μ M não foram avaliados, pois não houve desenvolvimento de um número adequado de estruturas que permitissem realizar a avaliação, indicando que nesta maior concentração a menadiona foi muito tóxica.

[039] Não foi observada diferença ($P > 0,05$) no diâmetro das vesículas unilamelares gigantes - GUVs - nos 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 vesículas unilamelares gigantes - 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).

[040] 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 3). Não foi observada diferença entre os tratamentos ($P > 0,05$), sendo detectadas 13,6% de vesículas unilamelares gigantes - 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.

[041] 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 μ M*	104	89,75 $\pm$ 2,69	6,95 $\pm$ 3,13 ^b
GUV+MD 7,5 μ M*	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 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 pelo teste de Tukey (P<0,05).

[042] 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 (µM)	Nº	Diâmetro (µM)
Controle	843	14,92 ± 0,19	77	14,63 ± 0,82 ^b
MD 5,0 µM**	708	14,90 ± 0,18	86	13,49 ± 0,59 ^b
MD 7,5 µM	790	15,30 ± 0,19	69	17,79 ± 0,94 ^a

Os dados estão apresentados na forma de média ± 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 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 estatisticamente pelo teste de Tukey (P<0,05)

- Avaliação da efetividade das GUVs como estruturas carreadoras de antioxidantes ao meio de cultivo *in vitro* de embriões.

[043] Este experimento teve como objetivo avaliar a viabilidade da utilização de vesículas unilamelares gigantes - 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 recomendado na literatura) com o efeito da cisteína encapsulada em vesículas unilamelares gigantes - GUVs - nas concentrações de 3 mM e 129 mM.

[044] 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 [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 %). Estes resultados estão sumarizados na Tabela 5.

[045] 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 ($P<0,05$).

[046] 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
GUV(Cist3mM)	-	3 mM (na GUV)***	116	83,97 ± 5,71 ^a	30,16 ± 1,59 ^a
GUV(Cist3mM)+MD	+	3 mM (na GUV)	113	88,37 ± 4,01 ^a	1,15 ± 1,15 ^b
GUV(Cist129mM)	-	129 mM (na GUV)***	112	50,05 ± 4,22 ^b	0,00 ^b
GUV(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 ($P<0,05$).

[047] 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 ± 0,01 ^{bc}
Cist	-	0,6 mM (diluída)**	29	0,16 ± 0,02 ^b
MD	+	-	9	0,34 ± 0,05 ^a
GUV(Cist 3mM)	-	3 mM (na GUV)***	25	0,09 ± 0,01 ^c

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); **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).

[048] Dessarte, as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - produzidas com cisteína em seu interior são mais eficientes para prevenir o aumento intracitoplasmático de ROS em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

[049] É certo que quando o presente invento for colocado em prática, poderão ser introduzidas modificações no que se refere a certos detalhes, sem que isso implique afastar-se dos princípios fundamentais que estão claramente substanciados no quadro reivindicatório, ficando assim entendido que a terminologia empregada não teve a finalidade de limitação.

Referências

- [050]** 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.
- [051]** 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.451-4577, 1996.

- [052] GUÉRIN P.; MOUATASSIM, S.E.L.; MÉNÉZO, Y. Oxidative stress and protection against reactive oxygen species in the pre-implantation embryo and its surroundings. *Human Reproduction Update*, v.7, p.175-189, 2001.
- [053] 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.
- [054] 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.
- [055] 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.
- [056] 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.
- [057] 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.
- [058] 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.
- [059] 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.

REIVINDICAÇÕES

1) **“MÉTODO PARA ENCAPSULAMENTO DE ANTIOXIDANTES DENTRO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES COMO CARREGADORAS DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS”**, caracterizado

por método para encapsulamento de antioxidantes acrescentar as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - contendo antioxidantes em sistemas de cultivo *in vitro* de gametas ou embriões de mamíferos, para a liberação dos antioxidantes para combater o estresse oxidativo característico do ambiente de cultivo *in vitro*; dito método é compreendido pelas etapas:

i) preparação de uma solução estoque do fosfolípido 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfocolina em clorofórmio, na concentração de 10^{-3} mol/L; é adicionado 0,5 mol% de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(lissamina rodamina B sulfonil) à solução de DOPC para a marcação da membrana com fluorocromo, visando sua posterior observação em microscopia de fluorescência;

ii) em seguida, essa solução é espalhada em uma lâmina de vidro recoberta com óxido de estanho dopado com índio/Indium Tin Oxide - ITO, sendo então seca em estufa para cultura bacteriológica a 60 °C por 1 hora; na sequência, uma segunda lâmina de vidro é colocada por cima da lâmina previamente mencionada, utilizando-se um espaçador de teflon entre ambas com o intuito de formar uma "câmara" de incubação; a câmara é então preenchida com a solução de eletroformação; a concentração de sacarose utilizada para a formulação da solução de eletroformação é determinada para ser iso-osmótica ao meio de cultivo de embriões *in vitro* (meio mSOF), cuja osmolaridade (260 mOsm kg⁻¹) é determinada em um osmômetro (Osmomat 3000); tanto a sacarose quanto a cisteína foram previamente diluídas em água ultrapura (Milli-Q);

iii) finalmente, uma tensão AC de 2,0 V a uma frequência fixa de 10 Hz é aplicada através da câmara por no mínimo 3 horas;

iv) posteriormente, a solução contendo as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - é removida da câmara com auxílio de uma seringa (3 mL) e armazenada a 4°C por até uma semana; as avaliações das vesículas unilamelares gigantes - GUVs são realizadas em microscópio invertido equipado com fluorescência, 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 de Software são posteriormente avaliadas com auxílio do programa Image J, utilizando-se de uma reta para mensurar o tamanho das vesículas unilamelares gigantes - GUV (de uma extremidade a outra) e assim determinar o seu diâmetro.

2) **“MÉTODO PARA ENCAPSULAMENTO DE ANTIOXIDANTES DENTRO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES COMO CARREGADORAS DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS”**, de acordo com a reivindicação 1 e numa primeira variação de solução de eletroformação para etapa (ii), caracterizado por solução de eletroformação poder ser constituída por sacarose a 0,26 mol/L para proceder à eletroformação de vesículas unilamelares gigantes - GUVs tradicionais.

3) **“MÉTODO”**, de acordo com a reivindicação 1 e numa segunda variação de solução de eletroformação para etapa (ii), caracterizado por solução de eletroformação poder ser constituída por sacarose a 0,26 mol/L e 3×10^{-3} mol/L de cisteína para proceder à eletroformação de vesículas unilamelares gigantes - GUVs preenchidas com cisteína [GUV(Cist 3mM)].

4) **“MÉTODO”**, de acordo com a reivindicação 1 e numa terceira variação de solução de eletroformação para etapa (ii), caracterizado por solução de eletroformação poder ser constituída por sacarose a 0,26 mol/L e 129×10^{-3} mol/L de cisteína para proceder à eletroformação de vesículas unilamelares gigantes - GUVs preenchidas com cisteína [GUV(Cist 129mM)].

5) **“MÉTODO”**, de acordo com as reivindicações 1, 2, 3 e 4, caracterizado por vesículas unilamelares gigantes - GUVs - produzidas com cisteína em seu interior prevenir o aumento intracitoplasmático de ROS em embriões bovinos produzidos *in vitro*.

FIG.1

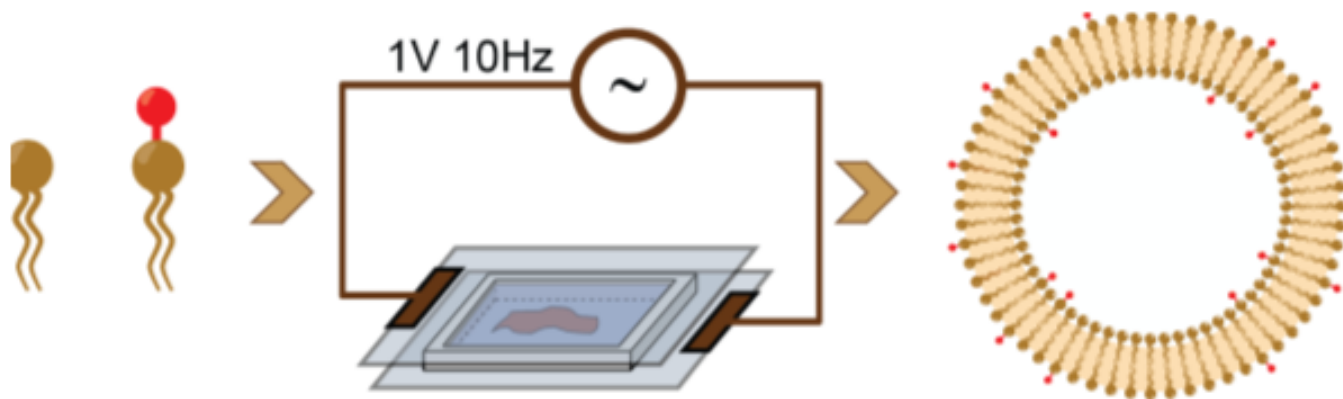


FIG.2

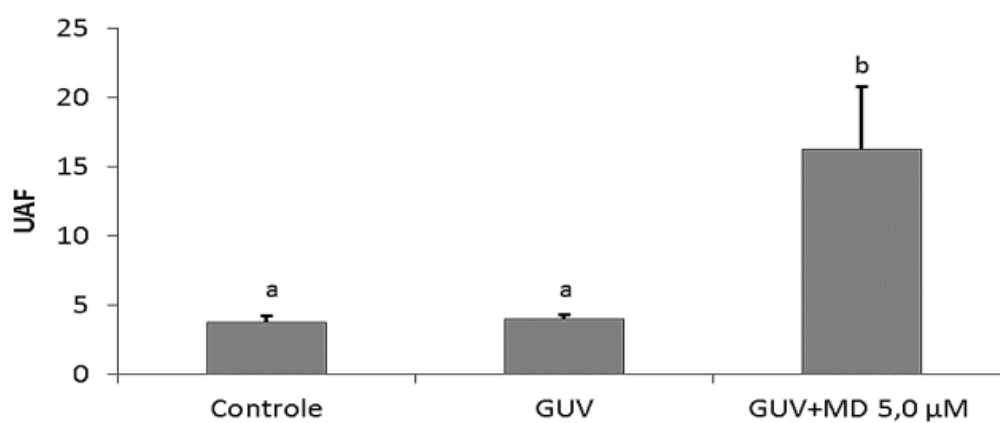
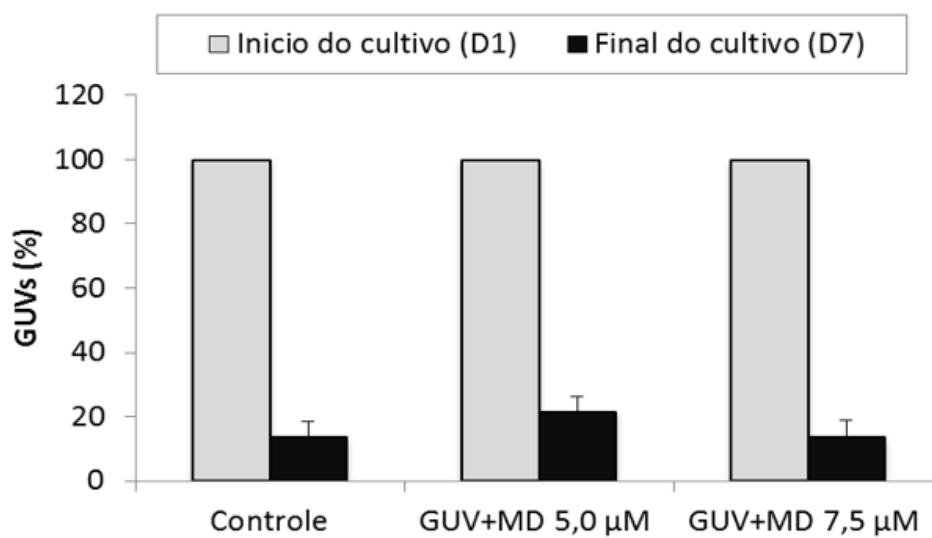


FIG.3



RESUMO

“MÉTODO PARA ENCAPSULAMENTO DE ANTIOXIDANTES DENTRO DE VESÍCULAS UNILAMELARES GIGANTES COMO CARREGADORAS DE ANTIOXIDANTES EM SISTEMAS DE PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES DE MAMÍFEROS”.

Dito método para encapsulamento de antioxidantes acrescenta as vesículas unilamelares gigantes - GUVs - contendo antioxidantes em sistemas de cultivo *in vitro* de gametas ou embriões de mamíferos, para a liberação dos antioxidantes para combater o estresse oxidativo característico do ambiente de cultivo *in vitro*.