



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
FACULDADE DE BIOTECNOLOGIA**

**HAMILTON SILVA DO NASCIMENTO**

**CO-CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS COM CÉLULAS-TRONCO ADULTAS  
DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO**

**Belém- PA**

**Setembro/2014**

**HAMILTON SILVA DO NASCIMENTO**

**CO-CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS COM CÉLULAS-TRONCO  
ADULTAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO**

Dissertação de Mestrado apresentada  
ao Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia do Instituto de Ciências  
Biológicas, da Universidade Federal  
do Pará, para obtenção do Título de  
Mestre em Biotecnologia.

**ORIENTADOR: PROF<sup>o</sup>. DR. MOYSÉS DOS SANTOS MIRANDA**

**Belém- PA**

**Setembro/2014**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

---

Nascimento, Hamilton Silva do, 1974-  
Co-cultivo de embriões bovinos com  
células-tronco adultas derivadas de tecido  
adiposo / Hamilton Silva do Nascimento. - 2014.

Orientador: Moyses dos Santos Miranda.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
do Pará, Instituto de Ciências Biológicas,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia,  
Belém, 2014.

1. Bovino Reprodução. 2. Bovino Embriões. 3.  
Fertilização in vitro. 4. Células-tronco. I.  
Título.

CDD 22. ed. 636.20824

**HAMILTON SILVA DO NASCIMENTO**

**CO-CULTIVO DE EMBRIÕES BOVINOS COM CÉLULAS-TRONCO  
ADULTAS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO**

Data de apresentação \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Moysés dos Santos Miranda (UFPA-ICB)

Orientador

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Otavio Mitio Ohashi (UFPA-ICB)

Examinador

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Patricia Neiva Coelho Schneider (UFPA-ICB)

Examinadora

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Simone do S. D. dos Santos (UFPA-ICB)

Examinadora

*“A persistência é o caminho do êxito”*

*Charles Chaplin*

*Dedico este trabalho aos meus  
pais, João Batista e Maria  
Helena e a minha esposa  
Patrícia.*

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos como aluno de pós-graduação, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

A esta universidade, seu corpo docente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior, eivado pela acendrada confiança no mérito e ética aqui presentes.

Ao Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda pela sua amizade e pela confiança nos momentos mais difíceis desta jornada e pela oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

As Professoras doutoras Patrícia Neiva Coelho Schneider e Simone do S. D. dos Santos e ao professor doutor Otávio Mitio Ohashi pelo paciente trabalho de revisão da redação e pela participação na banca de defesa desta dissertação de mestrado.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

Ao Prof. Dr. Otavio Mitio Ohashi, pela oportunidade, por todo aprendizado, incentivo, orientação e motivação.

À equipe do laboratório de Fertilização in vitro que me ajudaram, apoiaram e colaboraram para realização deste trabalho. Agradeço à Nathália, Thiago, Alessandra, Priscilinha, Paulo, Grazielle, Nagila, Carol, Felipe e Eduardo. Agradeço principalmente a Stefanne, Karynne, Miyuka, André, Priscilona e Cinthia por todas as lutas vividas juntos, por todos os obstáculos que me ajudaram a vencer, pelos conselhos e conversas, por todo tipo de ajuda, pela companhia e principalmente pela amizade. A Mayra por todo tempo dedicado a este trabalho, por todos finais de semana, feriados, pela ajuda e companheirismo, meu sincero, muito obrigado.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS.....	3
2.2	CÉLULAS-TRONCO.....	6
2.2.1	Células Tronco Pluripotentes: embrionárias e pluripotentes induzidas (iPSC).....	6
2.2.2	Células Tronco Multipotentes: células-tronco de origem adulta (CTOAs).....	9
2.3	CÉLULAS-TRONCO E A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES.....	13
2.4	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA.....	15
3	HIPÓTESE.....	18
4	OBJETIVOS.....	18
4.1	OBJETIVO GERAL.....	18
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
5	MATERIAL E MÉTODOS.....	19
5.1	ESQUEMA GERAL DO EXPERIMENTO.....	19
5.1.1	Experimento 1:.....	19
5.1.2	Experimento 2:.....	20
5.1.3	Experimento 3:.....	20
5.2	CARACTERIZAÇÃO DAS CTAs.....	21
5.2.1	Obtenção das células-tronco do tecido adiposo.....	21
5.2.2	Cultivo celular e congelação.....	22
5.2.3	Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais.....	22
5.2.3.1	Imunofenotipagem.....	22
5.2.3.2	Curva de crescimento.....	23
5.2.3.3	Diferenciação e colorações.....	24
5.3	PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES.....	25
5.3.1	Obtenção dos ovários, recuperação e seleção dos oócitos.....	25
5.3.2	Maturação in vitro e fecundação in vitro dos oócitos.....	25
5.3.3	Cultivo embrionário <i>in vitro</i> .....	26

5.3.4	Contagem do número total de células por embrião .....	27
5.3.5	Análise da expressão gênica dos embriões.....	27
5.4	SISTEMAS DE CO-CULTIVO EMBRIONÁRIO .....	29
5.4.1	Co-cultivo com células da granulosa .....	29
5.4.2	Co-cultivo com CTAs .....	29
5.5	CONDICIONAMENTO DO MEIO DE CULTIVO EMBRIONARIO COM CTAS.....	30
5.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
6	RESULTADOS .....	31
6.1	ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CTAS.....	31
6.2	PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES .....	34
6.2.1	Comparação de diferentes quantidades de CTAs no co-cultivo de embriões bovinos.....	34
6.2.2	Combinação de meio de cultivo e do tipo de célula no co-cultivo de embriões bovinos.....	35
6.2.3	Comparação do uso de células da granulosa e CTAs no co-cultivo de embriões bovinos produzidos in vitro.....	36
6.2.4	Comparação do co-cultivo com CTAs ou meio SOF condicionado por CTAs no cultivo in vitro de embriões bovinos .....	38
6.2.5	Comparação da concentração relativa dos transcritos de <i>POU5F1</i> , <i>G6PDH</i> e <i>HSP70</i> no uso de células da granulosa e CTAs no co-cultivo de embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> .....	40
7	DISCUSSAO.....	43
8	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

## Lista de abreviações

- AOPM: Grupo com meio suplementado com antioxidante
- bFGF: Fator de crescimento básico de fibroblasto
- BSA: “Bovine serum albumin” – Albumina sérica bovina
- CCOs: Complexos cumullus-oócito
- CD34: Cluster de diferenciação 34
- CD45: Cluster de diferenciação 45
- CD73: Cluster de diferenciação 73
- CD79: Cluster de diferenciação 79
- CD90: Cluster de diferenciação 90
- CD105: Cluster de diferenciação 105
- CÉLULAS VERO: Células do fígado do macaco verde africano
- cDNA: DNA complementar
- c-Myc: Fator de transcrição envolvido na proliferação celular.
- COND: Grupo com meio condicionado com CTAs
- CO-C: Grupo com co-cultivo
- CNDM: Grupo com meio condicionado
- CTAs: Células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo
- CTAs-BM: Materiais bioativos de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo
- CTE: Células-tronco embrionárias
- CTMCUh: Células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano
- CTMMO: Células-tronco mesenquimais de medula óssea
- CTMs: Células-tronco mesenquimais
- CTOAs: Células-tronco de origem adulta
- CTRL: Grupo sem co-cultivo (controle)
- CTA-10<sup>3</sup>: Grupo com co-cultivo com 10.000 CTAs/mL
- CTA-10<sup>4</sup>: Grupo com co-cultivo com 100.000 CTAs/mL
- CXCL12: Fator 1 derivado de células estromais
- DAPI: Contraste nuclear clássico para microscopia de imunofluorescência
- DMEM: “Dulbecco's Modified Eagle's médium” - Meio de Dulbeco modificado de Eagle
- DMSO: “Dimethyl Sulphoxide” – Dimetil sulfóxido
- E-CTR: Grupo controle exposto à luz
- EGF: “Epidermal growth fator” - Fator de crescimento epidermal

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FBS: “Fetal bovine serum” – Soro Fetal Bovino

FITC: “Fluorescein isothiocyanate” - Isotiocianato de fluoresceína

FIV: Fertilização *in vitro*

G6PDH: “Glucose-6-phosphate dehydrogenase” - Glicose-6-fosfato desidrogenase

GRAN: Grupo com co-cultivo com células da granulosa

hAT-MSCs: Células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo humano

hAT-MSCs-BM: Materiais bioativos derivados de células-tronco mesenquimais humanas derivadas de tecido adiposo humano

hES-BM: Materiais bioativos derivados de células-tronco embrionárias

HGF: Fator de crescimento de hepatócitos

HSPs: “Heat shock proteins” - proteínas de choque térmico

HSP70: proteína de choque térmico 70

HTF: Flúido tubário humano

IA: Inseminação Artificial

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IETS: “International Embryo Transfer Society” - Sociedade Internacional de Transferência de Embriões

IMDM: “Iscove's Modified Dulbecco's Medium” – Meio de Iscove modificado de Dulbecco

IMDM-G: Grupo com meio IMDM com co-cultivo de células da granulosa

IMDM-10<sup>4</sup>: Grupo com meio IMDM com co-cultivo de 10.000 CTAs/mL

iPSC: Células-Tronco Pluripotentes Induzidas

ISCT: “International Society for Cellular Therapy” - Sociedade Internacional de Terapia Celular

KLF4: Fator de transcrição indicador de células semelhantes a células-tronco

$\alpha$ -MEM: meio essencial  $\alpha$ -mínimo

MIV: Maturação *in vitro*

mRNA: “Messenger RNA” – RNA mensageiro

NADPH: Nicotinamida adenina dinucleotídeo

NE-CTR: Grupo não exposto à luz

OCT4: Fator de transcrição indicador de pluripotência.

PBS: “Phosphate Buffered Saline” - Tampão fosfato-salino

PIVE: Produção *in vitro* de embriões

POU5F1: “POU domain, class 5, transcription factor 1” - domínio POU, classe 5, fator de transcrição 4

PVA: “Polyvinyl alcohol” - Álcool polivinílico

SDHA: “Succinate dehydrogenase flavoprotein subunit A” - Succinato desidrogenase flavoproteína subunidade A

SOF: “Synthetic Oviduct Fluid” – Fluido Sintético do Oviduto

SOX2: Fator de transcrição fundamental para a manutenção da auto-renovação e pluripotência.

SPTZ- Espermatozóides

TALP: “Tyrode's albumin lactate pyruvate” - Albumina lactato piruvato de Tyrode

TE: Transferência de embriões

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral

VEGF- $\alpha$ : Fator de Crescimento Endotelial Vascular

YWHAZ : “Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide” - Tirosina 3-mono-oxigenase / triptofano 5-mono-oxigenase proteína de ativação, polipeptídeo zeta

### **Lista de símbolos**

g- Gramas

$\mu$ g- Microgramas

$\mu$ l- Microlitros

$\mu$ M- Micromolar

mg- Miligramas

mL- Mililitros

mm- Milímetros

U- Unidades

## Lista de Figuras

Figura 1: Produção de embriões bovinos no Brasil, de acordo com a técnica empregada, no período de 1995 a 2010. ....	4
Figura 2: Derivação de linhagens de células-tronco embrionárias (CTE) humanas e suas linhagens pluripotentes derivadas da massa celular interna do embrião em fase de blastocisto .....	7
Figura 3: Paradigma da terapia celular baseada na utilização de iPSCs. ....	9
Figura 4: Fotomicrografia de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de <i>Bos belgian blue</i> .....	31
Figura 5: Imunofenotipagem e coloração nuclear com DAPI (Contraste nuclear clássico para microscopia de imunofluorescência) de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo bovino. ....	32
Figura 6: CTAs diferenciadas em três linhagens após 21 dias de indução.....	33
Figura 7: Curva de crescimento de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo bovino (4 <sup>a</sup> passagem).....	34
Figura 8: Clivagem e formação de blastocistos bovinos no 2 <sup>o</sup> e 7 <sup>o</sup> dia de cultivo respectivamente, utilizando-se diferentes quantidades de CTAs na etapa de co-cultivo <i>in vitro</i> .....	35
Figura 9: Clivagem e formação de blastocistos bovinos no 2 <sup>o</sup> e 7 <sup>o</sup> dia de cultivo respectivamente na ausência de co-cultivo e em sistemas de co-cultivo com CTAs e com células da granulosa.....	37
Figura 10: Número total de células de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> com diferentes células utilizadas na etapa de co-cultivo.....	38
Figura 11: Clivagem e formação de blastocistos bovinos no 2 <sup>o</sup> e 7 <sup>o</sup> dia de cultivo em sistemas de co-cultivo com CTAs e com meio condicionado de CTAs.....	39
Figura 12: Número total de células,por blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meio SOF previamente condicionado por CTAs ou co-cultivados em meio SOF com CTAs.. ....	40
Figura 13: Concentração relativa dos transcritos de POU5F1 produzidos por embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em co-cultivo com células da granulosa ou co-cultivo com CTAs.....	41

Figura 14: Concentração relativa dos transcritos de G6PDH produzidos por embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em co-cultivo com células da granulosa ou co-cultivo com CTAs.....	42
Figura 15: Concentração relativa dos transcritos de HSP70 produzidos por embriões bovinos produzidos <i>in vitro</i> em co-cultivo com células da granulosa ou co-cultivo com CTAs.....	43

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Primers utilizados para análise da expressão gênica relativa. ....	28
Tabela 2 – Cultivo <i>in vitro</i> de embriões bovinos em dois diferentes meios de cultivo (SOF e IMDM) com dois tipos de células (Granulosa e CTAs) na etapa de co-cultivo .....	36
Tabela 3 - Eclosão de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> em diferentes sistemas de co-cultivo embrionário .....	37
Tabela 4 – Taxa de eclosão de blastocistos bovinos produzidos <i>in vitro</i> em meio SOF previamente condicionado por CTAs ou co-cultivados em meio SOF com CTAs.....	39

## RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIV) é uma biotecnologia utilizada para aumentar o potencial reprodutivo de animais geneticamente superiores, os embriões produzidos *in vitro* são de qualidade inferior aos produzidos *in vivo*, por isso técnicas tentam melhorar os índices de embriões produzidos *in vitro*. Uma técnica é o sistema de co-cultivo com células somáticas que removem metabólitos tóxicos e protegem contra o stress oxidativo. As células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTA) são células multipotentes que segregam fatores de crescimento e citocinas. As células-tronco foram utilizadas em co-cultivo *in vitro* de embriões bovinos em diferentes concentrações com o objetivo de melhorar o protocolo de PIVE. CTAs foram submetidas à diferenciação em três linhagens mesenquimais, e foi realizada a imunofenotipagem de marcadores específicos de membrana das CTMs. A taxa de clivagem foi avaliada no segundo dia após a fertilização e taxa de blastocistos no sétimo dia, quando foram armazenados para contagem do número total de células e expressão gênica. Os resultados foram analisados por ANOVA, Teste-t e pós-teste de Fisher, adotando um nível de significância de 5%. O tratamento do co-cultivo com CTAs influenciou significativamente a formação de blastocisto, o número total de células de embriões e a expressão gênica correlacionada a pluripotência e metabolismo de carboidratos. Estes resultados mostraram aumento da taxa de produção e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* em co-cultivo com CTAs em relação ao co-cultivo com células da granulosa. Os resultados deste trabalho indicam também que a presença constante de CTAs em co-cultivo é superior ao condicionamento com CTAs. Os efeitos verificados das CTAs podem ocorrer através de fatores solúveis ou via exossomos secretados pelas CTAs. Estudos futuros são necessários para esclarecer a possível via causadora dos efeitos positivos verificados neste trabalho pelas CTAs em co-cultivo.

Palavras-chave: células-tronco mesenquimais, co-cultivo, produção *in vitro* de embriões.

## ABSTRACT

The in vitro embryo production (IVP) is a biotechnology used to increase the reproductive potential of genetically superior animals, embryos produced in vitro are inferior in quality when compared in vivo. Techniques trying improve the rates of in vitro produced embryos. One technique is the co-culture system using somatic cells that remove toxic metabolites and protect against oxidative stress. Mesenchymal stem cells derived from adipose tissue (CTA) are multipotent cells that secrete growth factors and cytokines. The stem cells were used in in vitro co-culture of bovine embryos at different concentrations in order to improve the protocol PIVE. CTAs underwent differentiation into three mesenchymal lineages, and was performed immunophenotyping of specific membrane markers of MSCs. The cleavage rate was assessed on the second day after fertilization and blastocyst rate on the seventh day when they were stored for counting the total number of cells and gene expression. The results were analyzed by ANOVA, T-test and post-test of Fisher, adopting a significance level of 5%. Treatment of co-cultivation with CTAs significantly influenced the formation of the blastocyst, the total number of cells in embryos and correlated gene expression pluripotency and carbohydrate metabolism. These results showed increased production rate and quality of embryos produced in vitro co-culture with CTAs compared to co-culture with granulosa cells. These results also indicate that the constant presence of CTAs in co-culture is superior to conditioning with CTAs. Checked the effects of CTAs can occur through soluble factors or via exosomes secreted by CTAs. Future studies are needed to clarify the possible cause for positive effects observed in this work by the CTAs in co-cultivation.

Keywords: mesenchymal stem cells, co-culture, in vitro production of embryos.

## 1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos é uma biotécnica utilizada para acelerar e maximizar o potencial reprodutivo de animais zootecnicamente superiores, saudáveis ou com algum tipo de infertilidade adquirida (Gonçalves *et al.*, 2008).

A PIVE é composta por três etapas, a maturação *in vitro* (MIV), a fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo *in vitro* (CIV) dos embriões fecundados até o estágio de blastocisto, quando são então transferidos para o útero de fêmeas receptoras. Desde a década de 1980, quando nasceu o primeiro bezerro oriundo da PIVE (Brackett *et al.*, 1982), muito tem se investigado e avançado no sentido do aumento da quantidade e, principalmente, da qualidade do embrião bovino produzido *in vitro*, entretanto, até hoje a eficiência da técnica é baixa em comparação a produção *in vivo* de embriões. Diversos protocolos e experimentos têm sido realizados visando o aprimoramento das etapas da PIVE, em especial a etapa de CIV (Bilodeau-Goeseels, 2012).

Na etapa de CIV de embriões bovinos, ainda hoje, é de praxe que muitos grupos de pesquisa utilizem o cultivo de células somáticas juntamente com embriões (o chamado “sistema de co-cultivo”) em uma tentativa de simular o que ocorre *in vivo* durante o desenvolvimento pré-implantacional no qual o embrião cresce dentro do oviduto, sobre suas células ciliadas (Tsai *et al.* 1994; Moshkdanian *et al.*, 2011). Segundo estes autores, as células somáticas do sistema de co-cultivo podem ajudar no desenvolvimento embrionário por remover componentes tóxicos e as espécies reativas de oxigênio (EROs), além de secretarem fatores parácrinos úteis ao desenvolvimento embrionário inicial.

As células-tronco de origem adulta (CTOAs) são células com grau menor de diferenciação em comparação às células somáticas, possuem uma grande capacidade de auto-renovação e diferenciação em outros tipos celulares (Mummery *et al.*, 2010) e já foram isoladas e caracterizadas de diversos tecidos em diferentes espécies (Jiang *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2004; Musina *et al.*, 2008).

O tecido adiposo tem despertado grande interesse científico por ser uma fonte rica em células-tronco multipotentes e de fácil obtenção (Zhu *et al.*, 2008).

Diversos estudos, inclusive em animais de produção como em bovinos, têm demonstrado que as células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (CTAs) são células multipotentes com capacidade de diferenciação em adipócitos, condrócitos e osteoblastos (Dominici et al., 2006), sendo utilizadas atualmente tanto em experimentos laboratoriais quanto na prática clínica (Zuk, 2010), além de recentemente terem sido caracterizadas como possuindo uma grande capacidade de modulação parácrina de microambientes (Soleymaninejadian, Pramanik e Samadian, 2012).

A combinação entre o tema PIVE e células tronco foi proposta pioneiramente por Ling *et al.* (2008) que em seu estudo, em camundongos, relataram melhora na taxa de maturação *in vitro* dos oócitos, pelo uso de meio de maturação condicionado por células-tronco mesenquimais de medula óssea (CTMMO) obtidas também de camundongos. Kim *et al.* (2011) trabalhando com embriões bovinos e Park *et al.* (2013) com embriões suínos testaram com sucesso o uso de materiais bioativos derivados de células-tronco, embrionárias humanas (Kim *et al.*, 2011) e derivadas do tecido adiposo (Park *et al.*, 2013), como substitutos do soro fetal bovino durante o cultivo *in vitro* de embriões, demonstrando que tais materiais podem ser utilizados como um novo suplemento protéico para o desenvolvimento pré-implantacional de embriões produzidos *in vitro*.

O uso direto de células tronco no cultivo *in vitro* de embriões somente foi relatado por Moshkdanian *et al.* (2011) que utilizaram células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano (CTMCUh) no co-cultivo com embriões de camundongo que foram coletados *in vivo* (estágio de 2 – células) e então expostos a luz visível antes do cultivo *in vitro*. O resultado foi que o co-cultivo com as CTMCUh assim como o uso de antioxidantes no meio de cultivo, ajudaram na recuperação e no desenvolvimento dos embriões murinos estressados pela exposição luminosa.

Ainda não há relatos na literatura avaliando o uso direto de células tronco no sistema de co-cultivo de embriões produzidos totalmente *in vitro*. Sendo assim, este trabalho visa avaliar o uso de CTAs (espécie-específicas), comparado com o uso de um meio condicionado por estas CTAs na etapa de cultivo embrionário, utilizando o modelo bovino.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS

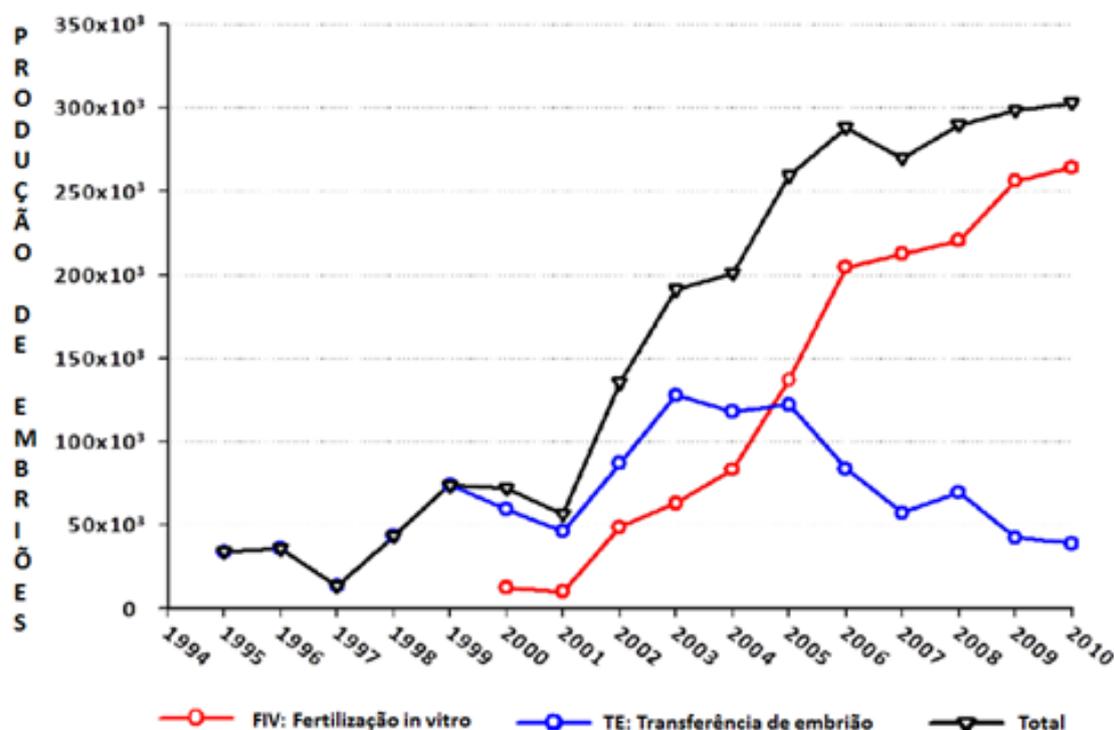
O Brasil é o maior exportador de carne bovina do mundo, com 22,8% de sua produção destinada ao exterior. As taxas produtivas do rebanho brasileiro, são baixas apenas quando comparadas aos países desenvolvidos, como os Estados Unidos, sendo o Brasil, o segundo maior rebanho mundial de bovinos. Segundo dados do IBGE, o efetivo de bovinos em 2010 teve aumento de 2,1% em relação a 2009.

A Região Norte tem apresentado um crescimento no rebanho superior às demais regiões desde 2009, sendo registrado um aumento de 4,1% em relação ao período anterior. O Pará se destaca neste contexto, com seu efetivo bovino estimado em 18.605.051 de cabeças; 766.593 cabeças de vacas ordenhadas, produzindo 560.916 mil litros de leite. Sendo que os três principais municípios em efetivo bovino em 2010 foram: São Félix do Xingu - PA, Corumbá - MS e Ribas do Rio Pardo - MS, (IBGE, 2010). O abate de bovinos no Brasil atingiu novo recorde histórico no 2º semestre de 2013, com cerca de 8,5 milhões de cabeças abatidas (IBGE, 2013). Assim sendo, o rebanho bovino é de fundamental importância para a economia paraense.

Sendo o rebanho bovino de tal importância, técnicas de reprodução para aumentar a produção desses animais têm sido amplamente aplicadas. Entre essas, a PIVE se destaca ao proporcionar à produção de animais geneticamente melhorados em maior número e em menor período de tempo. A biotecnologia de embriões tem sido amplamente utilizada na indústria de laticínios e de carne bovina. A transferência de embriões bovinos comercial tornou-se um grande negócio internacional. Atualmente, várias biotecnologias estão sendo utilizadas desde os estádios iniciais do oócito até a fase de embrião pré-implantacional no intuito de criar novas raças animais e acelerar a progressão genética (Wu e Zan, 2012).

A IETS (“International Embryo Transfer Society” - Sociedade Internacional de Transferência de Embriões) destaca o Brasil como referência mundial na produção *in vitro* de embriões, ficando a frente de países mais desenvolvidos.

A popularização da técnica de fertilização de bovinos em laboratório aconteceu de maneira gradual e motivada basicamente por necessidades mercadológicas. A técnica pode ser trabalhada em conjunto com a inseminação artificial (IA) e transferência de embriões (TE) (Sartori *et al.*, 2006). O Brasil se destaca no cenário internacional, por ser o país que mais produz embriões PIVE no mundo, conforme demonstrado na figura 1 (extraída e adaptada de Viana *et al.*, 2012).



**Figura 1:** Produção de embriões bovinos no Brasil, de acordo com a técnica empregada, no período de 1995 a 2010.

Para melhorar a qualidade de embriões produzidos em laboratório, pesquisas avançam na tentativa de mimetizar o processo de formação embrionária *in vivo*, de forma que se obtenham embriões qualitativa e quantitativamente superiores. Grandes desafios têm sido vencidos no que se refere às etapas de Maturação *in vitro* (MIV), Fertilização *in vitro* (FIV) e Cultivo *in vitro* (CIV) até o estágio de blastocisto, porém, ainda há muito que se investigar no que se trata de aprimoramento de técnicas.

Na década de 80, nasceu o primeiro bezerro oriundo de PIVE (Brackett *et al.*, 1982), entretanto, mesmo com o passar dos anos, a eficiência da técnica

em comparação a produção *in vivo* de embriões continua baixa, apesar de amplos esforços para compreender os efeitos das condições de cultivo *in vitro* sobre o desenvolvimento adequado dos embriões, em especial a composição básica e a suplementação dos meios de cultivo (Bilodeau-Goeseels, 2012).

A CIV é uma das etapas mais importantes do processo de PIVE, pois é nesta etapa em que o embrião se desenvolve, formando um organismo multicelular. A etapa de CIV vem sendo aperfeiçoada, tentando mimetizar ao máximo as condições *in vivo* (Gonçalves *et al.*, 2008).

Um protocolo clássico da etapa de CIV, e que ainda hoje é muito utilizado por muitos grupos de pesquisa para a produção *in vitro* de embriões de espécies domésticas, é o cultivo de células somáticas em conjunto com embriões (o chamado “sistema de co-cultivo”) em uma tentativa de simular o que ocorre *in vivo* durante o desenvolvimento pré-implantação no qual o embrião cresce dentro do oviduto, sobre suas células ciliadas (Tsai *et al.* 1994; Moshkdanian *et al.*, 2011).

Em alguns sistemas de co-cultivo embrionário, o embrião se desenvolve do estágio de zigoto até o estágio de blastocisto sobre uma monocamada de células somáticas tendo estas células o potencial de auxiliar no desenvolvimento embrionário aumentando a quantidade e a qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (Gordon, 2003). As células somáticas que geralmente são ou já foram utilizadas são, entre outras, as células epiteliais do oviduto, células endometriais, células do fígado do macaco verde africano (células VERO) e as mais amplamente utilizadas, as células da granulosa (Gonçalves *et al.*, 2008).

Estudos relatam que as células somáticas têm a capacidade de remover componentes tóxicos, como cátions bivalentes de metais pesados e inibidores metabólicos dos meios de cultura, e espécies reativas de oxigênio presentes no meio, auxiliando desta forma o desenvolvimento embrionário pré-implantacional (Moshkdanian *et al.*, 2011). A avaliação de novas fontes de células somáticas para o co-cultivo de embriões é interessante tanto para melhorar a qualidade embrionária, que ainda é inferior a do embrião produzido *in vivo*, como passo inicial para descobrir as demandas embrionárias em termos de fatores parácrinos importantes para o desenvolvimento embrionário inicial (Soleymaninejadian *et al.*, 2012).

## 2.2 CÉLULAS-TRONCO

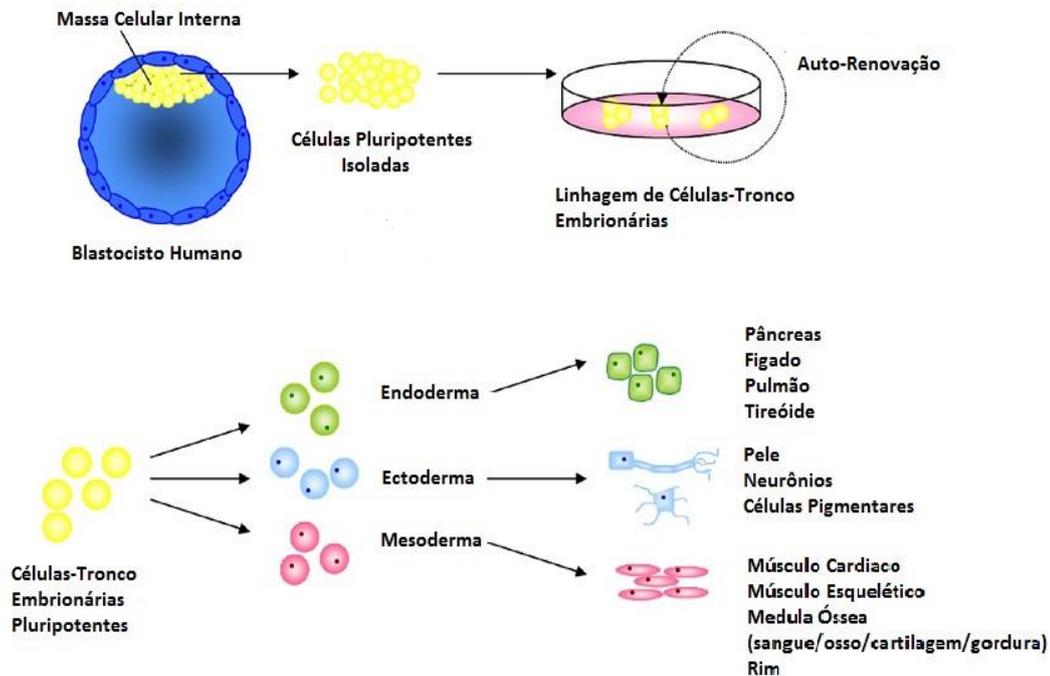
Células-tronco são células com grau menor de diferenciação, em comparação as células somáticas, e que podem se dividir e originar uma nova cópia de si e outra diferenciada. Ou seja, além da auto-renovação, as células-tronco também podem diferenciar em outros tipos de células (Mummery *et al.*, 2010). As células-tronco são encontradas em tecidos embrionários e extra-embrionários e muitos estudos vêm sendo direcionados para a utilização dessas células na terapia de várias doenças, e os resultados obtidos até então são bastante promissores, o que faz muitos autores acreditarem que as células-tronco representam a terapia do futuro, podendo significar a cura de determinadas doenças, tais como diabetes, cardiopatias, câncer e mal de Alzheimer (Souza *et al.*, 2010).

De acordo com a plasticidade ou potência, podem ser hierarquicamente divididas em: totipotentes (capacidade de diferenciação em todos os tipos de células, incluindo placenta), pluripotentes (diferenciação em células das três camadas germinativas; ectoderme, mesoderme e endoderme, mas não em células trofoblásticas), multipotentes (diferenciação em mais de um tipo celular, mas não necessariamente em todas as células de uma determinada camada germinativa) e unipotentes (diferenciação em apenas um tipo de célula) (Abdulrazzak *et al.*, 2010).

### 2.2.1 Células Tronco Pluripotentes: embrionárias e pluripotentes induzidas (iPSC)

Células-tronco embrionárias são células pluripotentes isoladas e cultivadas *in vitro* a partir de embriões de camundongos pela primeira vez por Martin Evans (1981) na Universidade da Califórnia em São Francisco. Apenas em 1998 ocorreu o isolamento de células-tronco embrionárias (CTE) humanas. Estas células-tronco foram isoladas a partir da massa celular interna de blastocistos entre o 5-7 dias do desenvolvimento embrionário, depois da fertilização do oócito pelo espermatozoide.

As CTE têm a característica de crescer indefinidamente *in vitro* (auto-renovação) além do potencial de diferenciar-se em praticamente todos os tipos celulares corporais (pluripotência) (Wang e Cooney, 2013). Como demonstrado na figura 2 abaixo, adaptada de Kingham *et al.*, 2013:



**Figura 2:** Derivação de linhagens de células-tronco embrionárias (CTE) humanas e suas linhagens pluripotentes derivadas da massa celular interna do embrião em fase de blastocisto. Quando mantidas em cultura, são submetidas a auto-renovação, proliferação e manutenção do estado de célula-tronco. *In vitro*, estas células são pluripotentes e apresentam capacidade de se diferenciar em qualquer tipo de célula das três camadas germinativas (endoderme, ectoderme, mesoderme) que compreendem o embrião propriamente dito. Teoricamente, as CTE podem ser manipuladas para formar qualquer tipo de célula do corpo humano, mas na realidade, isto requer um entendimento detalhado das pistas físicas e químicas necessárias para dirigir a diferenciação de um tipo de célula específico.

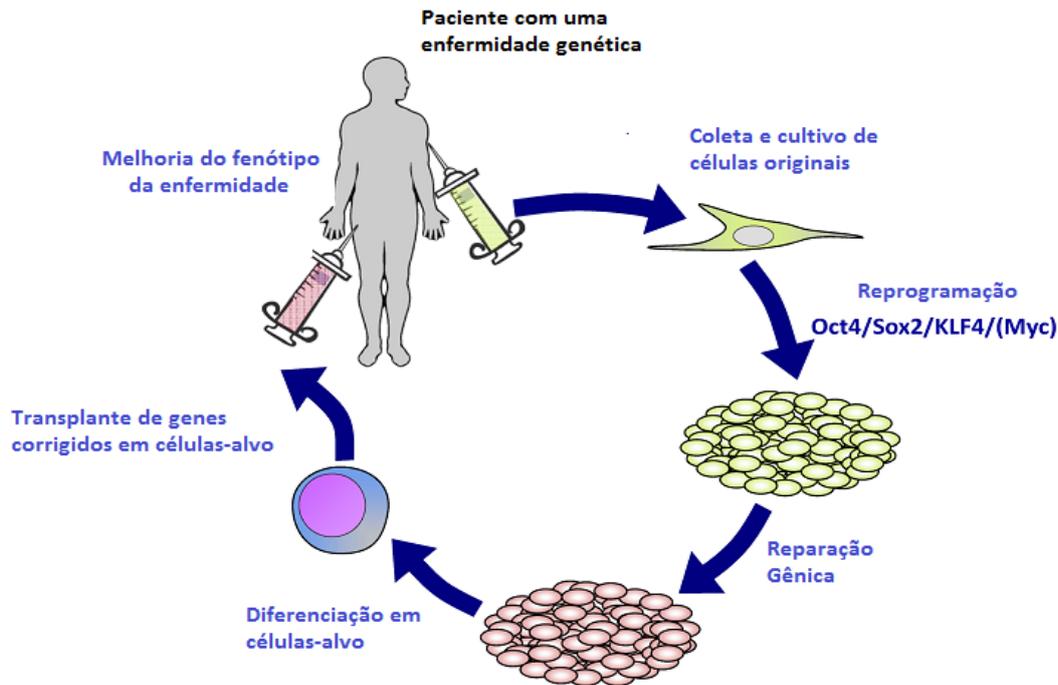
A pluripotência das CTEs é demonstrada por injeção em ratos imunodeficientes para produzir teratomas contendo células de cada uma das três camadas germinativas primárias (Evans e Kaufman, 1981; Thomson *et al.*, 1998) e pela injeção em blastocistos para formar uma prole quimérica com subsequente avaliação dos descendentes da quimera para confirmar a incorporação destas células na linhagem germinativa (Bradley *et al.* 1984).

As principais questões bioéticas associadas com células-tronco humanas envolvem sua derivação e uso na pesquisa. Embora existam questões éticas interessantes em torno da coleta e uso de células-tronco

somáticas (adultas), de células-tronco de fetos abortados e do sangue do cordão umbilical, a mais intensa controvérsia até à data tem-se centrado sobre a fonte de células-tronco embrionárias humanas. Em um futuro próximo, como o campo de células-tronco avança mais perto da clínica, questões éticas adicionais podem surgir sobre a tradução clínica de conhecimentos básicos de células-tronco em terapias com pacientes, terapias razoavelmente seguras, eficazes e acessíveis (Chopra *et al.*, 2013).

Felizmente, uma solução para os obstáculos políticos e éticos que tem limitado a pesquisa com células CTE está na notável descoberta de reprogramação biotecnológica, por Takahashi e Yamanaka, em 2006, revelando que com apenas quatro fatores de transcrição (Oct4, Klf4, Sox2 e c-Myc) poderia se redefinir o estado epigenético de células somáticas, tais como fibroblastos da pele, para células semelhantes ao estado embrionário, praticamente indistinguíveis das células CTE, sendo estas células chamadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSCs) (Goulburn *et al.*, 2011).

Por sua vez, tornou-se possível utilizar estas iPSCs para produzir vários tecidos necessários para o tratamento de diversas doenças, inclusive neurodegenerativas, os quais têm sido difíceis de se obter a partir de organismos vivos. Este avanço pode trazer um rápido progresso no esclarecimento dos mecanismos subjacentes às doenças e descoberta de novos medicamentos inovadores e levar a um rápido progresso na medicina regenerativa (Ito, Yagi e Suzuki, 2013). Como demonstrado na figura 3, adaptada de Cherry *et al.* (2013):



**Figura 3:** Paradigma da terapia celular baseada na utilização de iPSCs. Este paradigma combina a terapia gênica com a terapia celular e fornece uma correção gênica de células autólogas para transplante ao paciente.

No entanto, como a capacidade de proliferação dessas células pluripotentes é elevada, a capacidade de formação de câncer também é fortemente considerada. Além disso, em especial nas iPSCs, existem problemas particularmente com relação a necessidade de inserção de oncogenes e a possibilidade da formação de câncer (Kanno *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Células Tronco Multipotentes: células-tronco de origem adulta (CTOAs)

A utilização de CTE e iPSCs em situações clínicas está limitada atualmente devido a regulações celulares e por questões técnicas e éticas envolvendo a manipulação genética de células-tronco embrionárias, mesmo estas células, teoricamente, apresentando um alto benefício. As CTOAs parecem ser a população de células-tronco ideal para a prática da medicina

regenerativa, porque tais células não estão sujeitas as mesmas restrições (Mizuno, Tobita e Uysal, 2012).

CTOAs são derivadas de tecidos adultos. Estas células estão abaixo na hierarquia de potencialidade de células-tronco e pensava-se que elas teriam uma capacidade restrita de diferenciação em comparação à das CTE, entretanto, no decorrer da vida de um organismo, células-tronco não embrionárias mantêm um potencial de diferenciação multipotente. CTOAs podem ser obtidas de todos os tecidos dos 3 folhetos embrionários assim como da placenta e possuem a vantagem de poderem ser utilizadas de forma autóloga não apresentando problemas de rejeição ou controvérsias éticas (Körbling *et al.*, 2003; McCormick *et al.*, 2010). Teoricamente, terapias baseadas em células-tronco adultas podem ser usadas para regenerar um tecido comprometido, restabelecendo sua função e até mesmo reverter a deficiência física do paciente (Karp e Leng Teo, 2009).

Friedenstein e colaboradores, através de vários estudos durante as décadas de 1960 e 1970, demonstraram que o potencial osteogênico revelado através do transplante ectópico de células da medula óssea estava associado com uma subpopulação menor de células da medula. Estas células se diferem da maioria das células hematopoiéticas pela sua rápida aderência a placas de cultivo tecidual e a aparência da sua progênie semelhante a fibroblastos, indicando sua origem estromal da medula óssea (Friedenstein, 1990).

O atual conceito de células-tronco mesenquimais (CTMs) foi descrito pela primeira vez por Caplan (1991), através de experimentos clássicos demonstrando que o transplante de medula óssea para locais anatomicamente heterotópicos resulta em uma nova geração ectópica de medula óssea.

CTMs são células estromais não-hematopoiéticas capazes de diferenciar-se e contribuir para a geração de tecidos mesenquimais como osso, cartilagem, músculo, ligamento, tendão e gordura. CTMs são células raras na medula óssea representando 1 em cada 10.000 células nucleadas. Apesar de não serem células imortais, elas têm habilidade de expandir-se muitas vezes em cultura enquanto mantêm seu crescimento e potencial multilinhagem. As propriedades das CTMs fazem delas candidatas potencialmente ideais para engenharia tecidual (Chamberlain *et al.*, 2007).

Tem sido demonstrado que as CTMs, quando sistematicamente transplantadas, são capazes de migrar aos locais das lesões animais, sugerindo que as CTMs possuem a capacidade migratória. Entretanto, os mecanismos subjacentes à migração dessas células permanecem obscuros. Receptores de quimiocinas, seus ligantes e moléculas aderentes desempenham um papel importante na migração específica de leucócitos no tecido e também estão implicadas no tráfego de precursores hematopoiéticos dentro e pelo tecido (Bianco *et al.*, 2008)

Exemplos destas células incluem as células-tronco mesenquimais, assim como as células-tronco derivadas do tecido placentário, tal como as células epiteliais amnióticas. Estas células têm mostrado ação anti-inflamatória e aumentam o reparo em modelos animais que sofreram lesões. Estas células tem limitada capacidade de diferenciação, embora tenham sido diferenciadas em tecidos de diferentes folhetos embrionários *in vitro* (Moodley *et al.*, 2010; Ilancheran *et al.*; 2009).

Estas células podem ser derivadas de diferentes fontes como tecido adiposo, medula óssea e pele (Chopra *et al.*, 2013).

A ISCT (“International Society for Cellular Therapy” - Sociedade Internacional de Terapia Celular) criou requisitos mínimos para caracterizar uma célula como sendo CTMs, (Dominici, M *et al.*, 2006). São três requisitos básicos: as células devem ser isoladas de uma população de células mononucleares com base em sua aderência seletiva, em cultura, à superfície do plástico, comparado, no caso da medula óssea, às células hematopoéticas; a expressão das proteínas de membrana CD105, CD73 e CD90, e que as proteínas CD34, CD45 e CD79 não sejam expressas em mais de 95% das células em cultura; as células possam ser induzidas à diferenciação em tecido ósseo, cartilaginoso além do próprio tecido adiposo.

Estudos indicam que o transplante de células-tronco mesenquimais restaura órgãos danificados *in vivo*, tais como reparação de tecido ósseo e revascularização de tecido cardíaco isquêmico através da diferenciação de células-tronco e geração de novas células especializadas (Obradovic *et al.*, 2004; Menasché *et al.*, 2008; Chimutengwende *et al.*, 2012). Outros estudos têm mostrado que células-tronco mesenquimais em cultura secretam vários mediadores moleculares com função anti-apoptótica, imunomodulatória,

angiogênica e propriedades quimioatrativas que promovem reparo (Meirelles *et al.*, 2009; Yeung *et al.*, 2012).

O tecido adiposo é um tecido altamente complexo, composto de adipócitos maduros, preadipócitos, fibroblastos, músculo liso, células endoteliais, macrófagos/monócitos residentes e linfócitos (Weisberg *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2003). Assim como a medula óssea, é derivado do mesênquima, contém um estroma de suporte que pode ser facilmente isolado e permite a extração de um grande volume de tecido com uma baixa morbidade. Baseado nisso, o tecido adiposo pode representar uma fonte rica de CTOAs, podendo ter grande utilidade em diversos campos da ciência da medicina regenerativa (Rodriguez *et al.*, 2005).

Em 1966, Rodbell e Jones realizaram os primeiros trabalhos com o isolamento de células da gordura. Eles cortaram gordura de ratos, lavaram para retirar células de origem hematopoiética e incubaram fragmentos do tecido com colagenase, centrifugando o material resultante. Eles separaram a porção flutuante de adipócitos maduros do pellet da fração vascular estromal. A fração vascular estromal é composta de uma população de células heterogênea, incluindo células circulantes do sangue, fibroblastos, pericitos e células endoteliais bem como “pré-adipócitos” ou progenitores de adipócitos. Em 2001, Zuk e colaboradores confirmaram a existência de CTAs e mostraram o potencial de diferenciação adipogênico, osteogênico, condrogênico e miogênico destas células (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002).

Mais recentemente, Zhu *et al.*, (2008), otimizaram um método de colheita das CTAs em humanos e no laboratório conseguiram mantê-las em estágio indiferenciado por cerca de 25 passagens celulares, confirmando seu grande potencial de diferenciação, chegando a afirmar que se tratam de células-tronco melhores que as obtidas da medula óssea. De fato, atualmente, as CTAs podem ser consideradas como uma das melhores fontes de células-tronco para vários tipos de estudos clínicos, pela sua facilidade de isolamento, multipotência e ação reparadora (Zhu *et al.*, 2008; Moon *et al.*, 2012; Ong *et al.*, 2013).

Experimentos de utilização de CTAs para a terapia celular também tem mostrado um outro aspecto interessante da biologia destas células; de que o efeito benéfico do tratamento com as CTAs sobre órgãos/tecidos no corpo

também pode ser devido a fatores solúveis secretados por estas células mais do que sua capacidade de se diferenciar em diferentes linhagens maduras (Kim, Park e Sung, 2009). Aparentemente as CTMs também agem na reparação tecidual através de sua ação parácrina. Com efeito, estas células fornecem o microambiente trófico e sinais de sobrevivência, incluindo fatores de crescimento e citocinas. Descobertas recentes sugerem que microvesículas de lipídeos liberadas pelas células-tronco mesenquimais também podem ser importante na função fisiológica de células adjacentes do tecido em reparação (Baglio, Pegtel e Baldini, 2012).

Análises de fatores solúveis liberados de CTAs humanas oriundas de culturas nas passagens iniciais, indicam que elas secretam, entre outras substâncias, fatores de crescimento de hepatócitos (HGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF- $\alpha$ ), fator de crescimento básico de fibroblasto (bFGF), fator estimulante de colônia de macrófagos granulócitos, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleucina-6, -7, -8 e -11, adiponectina, angiotensina, catepsina D, pentraxina, proteína de zona de prenhez, proteína ligante de retinol e CXCL12 (Rehman *et al.*, 2004; Kilroy *et al.*, 2007; Salgado *et al.*, 2010).

O efeito imunomodulador das CTAs é uma das questões importantes na atualidade, pois este aspecto pode ser clinicamente relevante no contexto do efeito enxerto-*versus*-hospedeiro em transplantes heterólogos e tratamento de doenças auto-imunes (Soleymaninejadian *et al.*, 2012). O secretoma de CTAs tem o potencial para ser uma poderosa ferramenta para uso em futuras abordagens para desenvolver terapias e práticas na medicina regenerativa de células e tecidos (Mizuno, Tobita e Uysal, 2012).

### 2.3 CÉLULAS-TRONCO E A PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

Os primeiros relatos da utilização de células-tronco na PIVE foram propostos pioneiramente por Ling *et al.* (2008), neste trabalho o uso de meio condicionado por células-tronco mesenquimais da medula óssea (CTMMO) de camundongos, promoveu melhora na taxa de maturação in vitro de oócitos de

camundongos, sendo assim os primeiros a utilizar células-tronco espécie-específicas na PIVE. As células-tronco mesenquimais secretam uma variedade de citocinas, fatores de crescimento, apresentam auto-renovação e múltiplas formas de diferenciação. Alguns desses fatores bioativos poderiam melhorar a maturação meiótica *in vitro* e subsequentemente o desenvolvimento embrionário. O meio condicionado com células mesenquimais provou ser um meio efetivo para o crescimento folicular, maturação oocitária e consequentemente desenvolvimento embrionário (Ling *et al.*, 2008).

Kim *et al.*(2011) foram os primeiros trabalhando com embriões bovinos a utilizar com sucesso o uso de materiais bioativos derivados de células-tronco, embrionárias humanas, como substitutos do soro fetal bovino durante o cultivo *in vitro* de embriões. Células-tronco embrionárias (CTE) são versões expandidas da massa celular interna que compõem os blastocistos iniciais dos mamíferos. Componentes derivados de CTE podem conter vários materiais bioativos úteis ao crescimento de embriões em seu estado inicial pré-implantacional. Tais materiais podem ser utilizados como um novo suplemento proteico para o desenvolvimento pré-implantacional de embriões produzidos *in vitro*, evidenciando a utilização interespecífica de CTE humanas em modelo bovino de PIVE.

Materiais bioativos derivados de células-tronco humanas também foram utilizados por Park *et al.* 2013. Dessa vez, tais materiais foram derivados de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo (CTAs). Foram analisados os efeitos destes biomateriais como substitutos do soro fetal bovino durante o cultivo *in vitro* de embriões no desenvolvimento embrionário de suínos. As CTAs secretam materiais bioativos (CTAs-BM) que são benéficos na reparação tecidual e regeneração. Os CTAs-BM foram enriquecidos com fatores de crescimento e citocinas. De fato, estes biomateriais são uma nova alternativa de suplemento que pode melhorar o desenvolvimento dos embriões suínos tanto durante a partenogênese quanto na fertilização *in vitro*. Novamente houve utilização interespecífica de células-tronco humanas, dessa vez CTAs em modelo suíno de PIVE.

A utilização direta de células-tronco no cultivo *in vitro* de embriões, foi relatada, até então, apenas por Moshkdnian *et al.* (2011). Foram usadas células-tronco mesenquimais do cordão umbilical humano (CTMCUh) no co-

cultivo com embriões de camundongo que foram coletados *in vivo* (estágio de 2 células) e então expostos a luz visível antes do cultivo *in vitro*. Durante manipulações laboratoriais, oócitos e embriões são inevitavelmente expostos a condições não ideais que interferem no desenvolvimento normal dos embriões. O co-cultivo com as CTMCUh assim como o uso de antioxidantes no meio de cultivo, ajudaram na recuperação e no desenvolvimento dos embriões murinos estressados pela exposição luminosa. Os resultados demonstraram os efeitos benéficos dos antioxidantes e do co-cultivo com células-tronco na sobrevivência embrionária e nas taxas de clivagem e desenvolvimento embrionário indicando, portanto, que ocorreu interação interespecífica das CTMCUh em modelo murino de PIVE.

A utilização, ainda hoje, das células da granulosa no co-cultivo embrionário é amplamente difundida na produção *in vitro* de embriões bovinos. Levando-se em consideração os relatos de que as CTAs podem ser facilmente isoladas, inclusive de bovinos adultos, exibem multipotência e participam da regulação parácrina de microambientes, neste trabalho avaliamos sua utilização como alternativa ao co-cultivo tradicional com células da granulosa. Uma vez que, até o momento, apenas um trabalho relatou o uso direto das células tronco na produção *in vitro* de embriões bovinos, porém as células utilizadas foram às embrionárias de origem humana (Kim *et al.*, 2011).

Este projeto propôs o uso inédito de CTAs de origem bovina no co-cultivo de embriões produzidos totalmente *in vitro*, usando o modelo bovino (interação espécie-específica) bem como a avaliação da eficácia do meio condicionado por estas células no desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*.

## 2.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE EMBRIONÁRIA

Existem diversas abordagens para se avaliar a qualidade de embriões produzidos *in vitro*, entre elas as mais classicamente utilizadas são a análise da taxa de formação de blastocistos, das taxas de eclosão, a contagem do número total de células por embrião e mais recentemente, a análise da expressão de alguns genes preditores de qualidade embrionária (Gordon, 2003; Goossens *et al.*, 2005; Mundim, 2008) ou até mesmo seu transcriptoma (Misirlioglu *et al.*,

2006; Thomson *et al.*, 2013). Mesmo assim, ainda há uma forte necessidade de aperfeiçoamento dos métodos de avaliação e seleção embrionária existentes e o desenvolvimento de novos métodos, confiáveis e, se possível, não invasivos de modo a garantir que apenas os embriões com maior potencial de desenvolvimento sejam escolhidos para serem transferidos para as fêmeas receptoras (Ajduk *et al.*, 2013).

Na impossibilidade de transferência de diversos embriões para fêmeas receptoras visando avaliar a qualidade atribuída a algum determinado experimento de PIVE (teste-ouro), normalmente a melhor opção é tentar realizar o maior número de análises embrionárias incluindo as clássicas e se possível a análise da expressão de genes que indiquem alguns aspectos importantes da fisiologia embrionária como vem sendo feito por diversos autores (Goossens *et al.*, 2005; Lopes *et al.*, 2007; Banks *et al.*, 2009; Ramos-Ibeas *et al.*, 2014).

Dentre estes vários aspectos indicadores de qualidade embrionária e que podem ser avaliados por meio da análise da expressão genica podemos citar a análise da pluripotência embrionária. A pluripotência embrionária refere-se a uma célula-tronco que possui o potencial de se diferenciar em qualquer um dos três tipos de folheto embrionário: endoderme, mesoderme e ectoderme. Células-tronco pluripotentes podem dar origem a qualquer tipo de célula fetal ou adulta, mas não podem por si próprias desenvolver-se em um organismo fetal ou adulto porque não possuem a capacidade de criar tecido extra-embrionário, como a placenta (Abdulrazzak *et al.*, 2010). Diversos reguladores gênicos de células-tronco foram identificados como sendo essenciais para a formação da massa celular interna durante o desenvolvimento de embriões em pré-implantação e auto-renovação de células-tronco embrionárias pluripotentes. Entre estes reguladores estão incluídos os genes *POU5F1*, *SOX2* e *NANOG* (Chew *et al.*, 2005).

O gene *POU5F1* ("POU domain, class 5, transcription factor 1" - domínio POU, classe 5, fator de transcrição 4) antigamente chamado de *OCT-4* é o transcrito conhecido relacionado ao desenvolvimento embrionário que mais cedo se expressa, deste modo regula eventos iniciais do desenvolvimento, sendo muito utilizado como indicador de pluripotência (Chau *et al.*, 2002; Yamaguchi *et al.*, 2005), pois sua ausência seria indicativa de uma perda da

pluripotência (Pant e Keefer, 2009). *POU5F1* é um regulador transcricional, necessário para a manutenção dos primeiros tipos de células pluripotentes em embriões e células-tronco embrionárias de mamíferos (Boyer *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 2006). O gene *POU5F1* inclusive é um dos 4 fatores descritos por Takahashi e Yamanaka, em 2006, para a indução artificial da pluripotência em células somáticas (Goulburn *et al.*, 2011).

Um outro aspecto importante da fisiologia embrionária é o metabolismo e por sua vez o gene *G6PDH* (“Glucose-6-phosphate dehydrogenase” - Glicose-6-fosfato desidrogenase) está relacionado ao cromossomo X e codifica a enzima limitadora da taxa da via das pentoses, que está crucialmente envolvida no metabolismo da glicose-6-fosfato (Shimizu *et al.*, 1981).

A via das pentoses é ativada durante o desenvolvimento e gera fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) para a biossíntese de esteróides e ácidos graxos. Fornece também células com ribose-5-fosfato para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos. Além disso, o NADPH é crítico para a manutenção da glutatona (GSH) que em sua forma reduzida é fundamental para a desintoxicação de radicais livres e peróxidos lipídicos. Desta forma, embriões e fetos que apresentem deficiência nesta enzima podem ser mais susceptíveis ao estresse oxidativo (RIEGER, 1992).

Através da geração de NADPH na via das pentoses, *G6PDH* também participa na desintoxicação de espécies reativas de oxigênio e por consequência tem sido considerado um citoprotetor em resposta ao estresse oxidativo e a danos ao DNA (Nicol *et al.*, 2000).

A abundância relativa de *G6PDH* demonstrou ser quase duas vezes maior em embriões bovinos em estágio pré-implantação femininos produzidos *in vitro*, em comparação com os seus homólogos masculinos. (Gutiérrez-Adán *et al.*, 2000; Peippo *et al.*, 2002), porém nenhuma diferença entre embriões fêmeas e machos produzidos *in vivo* foi observada (Wrenzycki *et al.*, 2002). A maior expressão de *G6PDH* foi encontrada nas mórulas e blastocistos em embriões PIVE cultivados sob alta e baixa tensão de O<sub>2</sub> em relação aqueles produzidos *in vivo* (Balasubramanian *et al.*, 2007).

Um terceiro aspecto indicador de qualidade embrionária muito avaliado são as HSPs (“Heat shock proteins” - proteínas de choque térmico) que pertencem a uma família de proteínas chaperonas evolutivamente conservadas

e induzidas por vários estímulos tais como, infecções, altas temperaturas, radicais livres e stress mecânico (Macario *et al.*, 2006). Entre as HSPs conhecidas a *HSP70* (proteína de choque térmico 70) está envolvida no processo de dobramento de proteínas através da membrana intracelular e nas interações com proteínas sinalizadoras de transdução (Nollen *et al.*, 2002; Voellmy *et al.*, 2007). Outra função do *HSP70* é inibir a apoptose celular induzida por vários fatores de stress. Além disso, este gene previne a morte celular através de interações com genes reguladores de apoptose como o Citocromo C (Beere *et al.*, 2000; Gurbuxani *et al.*, 2003). Quanto à ativação da *HSP70*, sabe-se que não está relacionada apenas com a variação de temperatura, mas também com o estresse celular provocado por produção de peróxido de hidrogênio, infecções e inflamações (Paula-Lopes e Hansen 2002; Ahn e Thieli, 2003). A manipulação, o sexo dos embriões e o ambiente de cultivo podem alterar a atividade transcricional das HSPs (Lazzari *et al.*, 2002; Morton *et al.*, 2007).

### **3 HIPÓTESE**

O uso de CTAs no co-cultivo *in vitro* de embriões bovinos melhora a quantidade e a qualidade dos embriões em comparação ao uso de células da granulosa.

### **4 OBJETIVOS**

#### **4.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o uso de CTAs no co-cultivo de embriões bovinos, visando aprimorar o protocolo de produção *in vitro* de embriões.

## 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e caracterizar a multipotência de CTAs bovinas.
- Comparar o uso de diferentes concentrações de CTAs no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.
  - Investigar o efeito da combinação de meio de cultivo embrionário e do tipo celular no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.
  - Comparar o uso de células da granulosa e CTAs no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.
  - Comparar o uso de CTAs e de meio de cultivo embrionário condicionados por CTAs no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 ESQUEMA GERAL DO EXPERIMENTO

#### 5.1.1 Experimento 1: Comparação do uso de diferentes concentrações de CTAs no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*

O objetivo deste experimento foi analisar duas diferentes concentrações de CTAs, em comparação à utilização de células da granulosa, no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Foram avaliadas as taxas de clivagem e formação de blastocistos. Os grupos experimentais estão descritos a seguir:

**CTRL:** Sem co-cultivo (Controle)

**GRAN:** Co-cultivo com células da granulosa

**CTA-10<sup>3</sup>:** Co-cultivo com 10.000 CTAs/mL

**CTA-10<sup>4</sup>:** Co-cultivo com 100.000 CTAs/mL

5.1.2 Experimento 2: Investigação do efeito da combinação de meio de cultivo embrionário e do tipo celular no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

O objetivo deste segundo experimento foi investigar o efeito da combinação de meio de cultivo e do tipo de célula no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Foram testados dois meios de cultivo, sendo um deles o meio de cultivo embrionário (SOF: Synthetic Oviduct Fluid – Fluido Sintético do Oviduto) e o outro, o meio de cultivo celular (IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium – Meio de Iscove modificado de Dulbecco), em combinação com células da granulosa ou com as CTAs (em quantidade previamente definida). Foram avaliadas as taxas de clivagem e formação de blastocistos. Os grupos experimentais estão descritos a seguir:

**SOF-CTA-10<sup>4</sup>**: meio SOF com co-cultivo de 100.000 CTAs/mL

**IMDM**: meio de cultivo IMDM sem co-cultivo

**IMDM-GRAN**: meio IMDM com co-cultivo de células da granulosa

**IMDM-CTA-10<sup>4</sup>**: meio IMDM com co-cultivo de 100.000 CTAs/mL

5.1.3 Experimento 3: Comparação do uso de células da granulosa e CTAs no co-cultivo de embriões bovinos e comparação do uso de CTAs e de meio de cultivo embrionário condicionados por CTAs no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Nesta última etapa o objetivo foi analisar a melhor concentração de CTAs utilizada no experimento 1 em comparação ao uso de células da granulosa no co-cultivo de embriões bovinos. Foram avaliadas as taxas de clivagem e formação de blastocistos. Depois de quantificados, parte dos blastocistos foi utilizada para a contagem do número total de células e parte foi armazenada para a análise da expressão gênica.

Ainda nesta foi analisado se o condicionamento do meio de cultivo com CTAs pode substituir a presença das CTAs. Foram avaliadas as taxas de clivagem e formação de blastocistos.

**CTRL:** Sem co-cultivo (Controle)

**GRAN:** Co-cultivo com células da granulosa

**CTA-10<sup>4</sup>:** meio SOF com co-cultivo de CTAs

**COND:** meio condicionado com CTAs

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO DAS CTAs

### 5.2.1 Obtenção das células-tronco do tecido adiposo

O tecido adiposo foi coletado de abatedouro local SOCIPE (Sociedade Cooperativa dos Pecuaristas), localizado no bairro do Tapanã, (Belém – PA). O tecido foi retirado da região do peito de uma fêmea bovina adulta (*Bos belgian blue*) não gestante, sendo extraído com auxílio de materiais cirúrgicos para a recuperação de cerca de 5 g de tecido adiposo, que foi lavado com solução salina fria suplementada com 400 µg/mL de estreptomicina (Gibco) e 400 unidades/mL de penicilina (Gibco), acondicionado em frasco plástico estéril e transportado, a aproximadamente 4°C, até o laboratório de Fecundação *in vitro* da UFPA dentro de um período máximo de 4h.

No laboratório, o tecido foi lavado em PBS (“Phosphate Buffered Saline” - Tampão fosfato-salino), contendo 50 µg/mL de gentamicina, e macerado com auxílio de lâmina de bisturi até formar uma massa homogênea. A digestão enzimática da amostra foi realizada segundo Ren *et al.*, (2010) com colagenase tipo I (Sigma), diluída em PBS na concentração de 1 mg/mL, por um período de 2 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>. Após incubação, a ação da colagenase foi neutralizada com a adição de igual volume de IMDM-10%. O tecido tratado foi centrifugado por 5 minutos a 200 X g e, em seguida, o sobrenadante, contendo adipócitos maduros, foi descartado e o precipitado, contendo fração vascular estromal, foi novamente centrifugado sob as mesmas condições. Em seguida, o *pellet* foi ressuspenso em IMDM-10% FBS e uma alíquota de 2 µL foi submetida ao teste de viabilidade celular pela técnica de coloração com igual volume de Azul Tripán em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico, fazendo-se a contagem de células mortas coradas e células íntegras não coradas.

### 5.2.2 Cultivo celular e congelação

As CTAs foram cultivadas com trocas regulares de meio de cultivo (IMDM com 10% FBS: Fetal bovine serum – Soro Fetal Bovino) a cada 3 dias até atingirem a confluência de 70-80%, quando as células foram repicadas com Tripsina 0,25% (Tryple Express, Gibco) previamente aquecida a 38,5°C. As células foram repicadas duas vezes e congeladas na segunda passagem (P2) para posterior uso nos experimentos. O meio de congelação foi o IMDM suplementado com 20% de SBF, 50 µg/mL e gentamicina e 10% DMSO (“Dimethyl Sulphoxide” - Hibry Max, Sigma). As células em P2 foram repicadas como descrito acima, ressuspensas em 1 mL de meio de congelação e então envasadas em palhetas-finas (250µL) a uma concentração de 10<sup>6</sup> céls/ mL. As palhetas foram mantidas a 4°C por 1 hora, a -20 ° C por mais 1 hora, a -70 ° C por 20 minutos e então estocadas em nitrogênio líquido. Quando necessário, as células foram descongeladas em banho maria a 37°C por 30 segundos, centrifugadas a 300 X g, por 5 minutos e então resuspensas em IMDM-10% SFB e cultivadas conforme já descrito.

### 5.2.3 Caracterização das Células-Tronco Mesenquimais

#### 5.2.3.1 Imunofenotipagem

De acordo com os critérios estabelecidos pela ISCT, as células foram caracterizadas pela presença de marcadores de superfície de membrana específicos de CTMs: CD105 (endoglin), CD90 (Thy-1) e CD73, e também para a ausência de marcadores exclusivos de células hematopoiéticas, CD34, CD45 e CD79, a fim de excluir a possibilidade de contaminação por outros cultivos celulares.

Os anticorpos primários e o anticorpo secundário goat anti-mouse FITC (“Fluorescein isothiocyanate” - Isotiocianato de fluoresceína) foram adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), enquanto que os anticorpos secundários conjugados com Alexa 488 e Alexa 594 foram adquiridos da

Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA). As CTAs foram plaqueadas, em P4, sobre lamínulas e cultivadas por dois dias. Posteriormente, as células foram lavadas em PBS e fixadas em Paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente e novamente lavadas em PBS. Em seguida, as células foram incubadas em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA) e 0,3M de glicina (solução de bloqueio) por 30 minutos em temperatura ambiente. Então, foi realizada incubação com os anticorpos primários (CD105, CD90, CD73, CD34, CD45 e CD79), diluídos na mesma solução de bloqueio (1:50), permanecendo overnight a 4 °C em câmara úmida. Os controles negativos foram considerados em todas as análises de incubação, sem anticorpos primários.

As células foram lavadas em PBS e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente, com 1:150 (Alexa488 e Alexa594) ou 1:250 (Goat anti-mouse FITC). Os núcleos das células foram corados com 10 µg/mL de Hoechst 33342 em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas, montadas em lâminas e analisadas em um microscópio de fluorescência (Nikon Eclipse TE 300, Nikon Instruments Inc., Tóquio, Japão). Os controles negativos foram também analisados.

#### 5.2.3.2 Curva de crescimento

A característica de crescimento das CTAs foi avaliada, segundo protocolo de Gade *et al.*, (2012). As células, em P4, foram plaqueadas ( $10^4$  células/poço) em placas de 24 poços (TPP) com IMDM-10% por 12 dias, sendo renovado o meio de cultivo a cada três dias. A quantidade de células em cada poço foi estimada, com o auxílio da câmara de Neubauer, a cada 48 horas totalizando 6 momentos de análise para a composição da curva de crescimento celular.

### 5.2.3.3 Diferenciação e colorações

Para diferenciação em adipócitos as células, em P4, foram inicialmente incubadas em placa de 24 poços, contendo IMDM-10%, em uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Após 3 dias, o meio de expansão foi substituído pelo kit de diferenciação adipogênica (STEMPRO, Gibco) e permaneceram em cultivo por 21 dias, sendo a troca do meio realizada a cada 3 dias. Como controle negativo, um número igual de células foi incubado com meio de cultivo por igual período. Para confirmar a diferenciação em adipócitos, após 21 dias as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas em Paraformaldeído 4% por 1 hora a temperatura ambiente, sendo lavadas novamente em PBS e coradas com 1,25% Oil Red O por 5 minutos para a visualização do acúmulo intracelular de gotas lipídicas.

Para diferenciação osteogênica, as células foram inicialmente incubadas em placas de 24 poços, contendo IMDM-10% SFB, em uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup>. Após 3 dias, o meio de expansão foi substituído pelo kit de diferenciação osteogênica (STEMPRO, Gibco) e as células permaneceram em cultivo por 21 dias, sendo a troca do meio realizada a cada 3 dias. Como controle negativo, um número igual de células foi incubado com meio de cultivo por igual período. Para confirmar a diferenciação, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas em Paraformaldeído 4% por 20 minutos a temperatura ambiente, sendo lavadas novamente em PBS e coradas com Alizarin Red S 2% por 5 minutos para a visualização do depósito de cálcio.

Para diferenciação condrogênica, uma densidade de  $0,25 \times 10^7$  células/mL foi plaqueada como uma micromassa durante 2 horas. Em seguida, foi adicionado o kit de diferenciação condrogênica (STEMPRO, Gibco) e as células permaneceram em cultivo por 21 dias, sendo a troca do meio realizada a cada 3 dias. Como controle negativo, um número igual de células em micromassa foi incubado com meio de cultivo por igual período. Para confirmar a diferenciação em condrócitos, o protocolo de fixação foi o mesmo para células osteogênicas. As células foram coradas com Alcian Blue 1% por 5 minutos para a visualização de glicosaminoglicanos.

### 5.3 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

#### 5.3.1 Obtenção dos ovários, recuperação e seleção dos oócitos

Os ovários foram obtidos em abatedouro local; SOCIPE (Sociedade Cooperativa dos Pecuáristas), localizado no bairro do Tapanã, (Belém – PA). Foram coletados logo após o abate, lavados em PBS e acondicionados em frasco com solução salina (0,9% cloreto de sódio) à temperatura de 30 a 35 °C, sendo transportados ao laboratório de Fecundação *In Vitro* do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará dentro de um período máximo de 2 horas.

Folículos antrais de 2 a 8 mm foram puncionados utilizando-se agulhas de 19 Gauge e seringas de 10 mL, sendo o fluido folicular obtido, depositado em tubos de 15 mL. Terminada a aspiração, os tubos foram centrifugados por 5 segundos a 300 X g, de forma que ocorresse à sedimentação, visualizando-se o sobrenadante e o pellet (onde se encontram os complexos *cumulus oócito* - CCOs). A porção líquida foi desprezada e o sedimento transferido para uma placa de Petri estéril de poliestireno de 60 mm de diâmetro.

O rastreamento dos CCOs foi realizado com auxílio de lupa estereomicroscópica, utilizando-se de tubo capilar, sob o fluxo laminar. Os CCOs com citoplasma homogêneo, sem vacúolos ou grânulos escurecidos, apresentando células do *cumulus oophorus* compactas e refringentes, foram lavados e selecionados, grau I e II, em TCM 199 Hapes acrescido 10% de FBS (v/v), 0,22 mM piruvato, 62,6 µg/mL penicilina, 50 µg/mL gentamicina (TCM 199-Hepes).

#### 5.3.2 Maturação in vitro e fecundação in vitro dos oócitos

Os CCOs selecionados foram incubados em gotas de 100µL de meio de MIV (Meio 199, tampão bicarbonato de sódio, suplementado com 10% FBS (v/v), 0,5 µg/mL FSH, 50 µg/mL LH, 0,5 µg/mL EGF (“Epidermal growth fator” - Fator de crescimento epidermal), 22 µg/mL de piruvato e 50 µg/mL de

gentamicina) em placas de petri de 35 mm sob óleo mineral estéril, por um período de aproximadamente 22 horas.

Para a fecundação *in vitro*, foi utilizado sêmen congelado de um único touro (*Bos belgian blue*). O método de separação dos espermatozoides foi o de gradiente de densidade descontínuo de Percoll. A mini-palheta (250 µl) de sêmen foi descongelada em água a 35 °C durante 30 segundos. Em seguida, o sêmen foi depositado sobre a coluna de 800µL de Percoll (400µL gradiente 45% e 400µL gradiente 90%) e centrifugado a 200 X g durante 7 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado em 800 µl de meio TALP (“Tyrode's albumin lactate pyruvate” - Albumina lactato piruvato de Tyrode) por centrifugação a 200 X g durante 3 minutos para remoção dos resíduos de Percoll.

Após as lavagens, a concentração espermática foi determinada, com auxílio de uma câmara de Neubauer e ajustada para  $2 \times 10^6$  spz/mL. Os espermatozoides foram colocados em gotas de 80 µL de meio de fecundação (TALP, suplementado com 10 µg /mL de heparina, 2 µM de penicilamina, 1 µM de hipotaurina, 0,25 µM de epinefrina e 6 mg/mL BSA), junto com os CCOs (20 a 25 por gota). Oócitos e espermatozoides permaneceram co-incubados nas mesmas condições citadas para a MIV, em placas de petri sob óleo mineral estéril, por um período de aproximadamente 24 horas.

### 5.3.3 Cultivo embrionário *in vitro*

Após 24 horas de FIV os prováveis zigotos foram submetidos a sucessivas pipetagens para retirada das células do *cumulus oophorus* restantes e dos espermatozoides aderidos à zona pelúcida e então, transferidos para gotas (100µL) de meio de cultivo SOF suplementado com 5% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), 6 mg/mL de BSA e 50 µg/mL de gentamicina (SOF-cultivo) onde permaneceram por 7 dias incubados em estufa a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade.

Os embriões foram analisados sob lupa no segundo dia, para a contagem da clivagem e no sétimo dia, para a contagem dos blastocistos

formados, os quais também foram avaliados morfológicamente (Grau 1, 2 ou 3) de acordo com o Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (Stringfellow e Seidel, 1998).

Nesta etapa do processo da produção *in vitro* de embriões, 3 experimentos foram realizados, conforme descrito anteriormente.

#### 5.3.4 Contagem do número total de células por embrião

Após a avaliação da taxa de desenvolvimento embrionário em D7 (sétimo dia de cultivo), os blastocistos foram fixados em paraformolaldeído a 3,4%, corados com fluorocromo Hoechst 33342 (10 µg/mL) em PBS por 10 minutos, montados entre lâmina e lamínula e visualizados em microscópio de epifluorescência equipado com filtro de excitação (365nm) e filtro de barreira (410 nm). Fotomicrografias foram tiradas e o número total de núcleos de cada embrião foi quantificado manualmente.

#### 5.3.5 Análise da expressão gênica dos embriões

Os blastocistos eclodidos foram lavados três vezes em PBS contendo 0,1% (m/v) de PVA ("Polyvinyl alcohol" - Álcool polivinílico) e transferidos em um volume de 5 µL de RNAlater (Applied Biosystems) para microtubos de 0,2 mL, contendo em média cinco embriões, e estocados em freezer a -20°C até o momento da extração de RNA.

Cada grupo experimental continha 3 *pools* de 9 embriões eclodidos. A extração do RNA total do *pool* foi realizada utilizando o kit RNeasy micro kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA) seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi tratado com DNase I (fornecido com o kit de extração de RNA) para evitar a contaminação do DNA genômico. Em seguida foi realizada a transcrição reversa utilizando o kit High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para obtenção do cDNA, seguindo as instruções do fabricante.

O cDNA foi analisado utilizando um ensaio de quantificação relativa por PCR em tempo real (Real Time StepOne Plus PCR System, Applied

Biosystems), usando Power SYBR-Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Auckland, New Zealand).

Os oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados no programa Primer3 e sintetizados pela empresa Prodimol. A sequência dos oligonucleotídeos, número de pares de base, e número de acesso no GenBank dos genes alvo (*POU5F1*, *G6PDH* e *HSP70*) e dos controles endógenos (*YWHAZ* e *SDHA*) estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1** – Primers utilizados para análise da expressão gênica relativa.

Genes	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Amplicon	GenBank
<b><i>POU5F1</i></b>	GGTGTTCAGCCAAACGACTATC TCTCTGCCTTGCATATCTCCTG	143 pb	NM174580.1
<b><i>G6PDH</i></b>	CGCTGGGACGGGGTGCCCTTCATC CGCCAGGCCTCCCGCAGTTCATCA	347 pb	XM_0493
<b><i>HSP70</i></b>	GCCAGGAAACCAGAGACAGA CCTACGCAGGAGTAGGTGGT	539 pb	M98823
<b><i>YWHAZ</i></b>	GCATCCCACAGACTATTTCC GCAAAGACAATGACAGACCA	120 pb	BM446307
<b><i>SDHA</i></b>	GCAGAACCTGATGCTTTGTG CGTAGGAGAGCGTGTGCTT	185 pb	NM_174178

Para a PCR, cada 10 µL do mix de reação consistiu em 5 µL de SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 µM de cada primer (exceto 0,2 µM para o primer *POU5F1*) e 4 µL da amostra de cDNA diluído 1:20. As condições de termociclagem foram as seguintes: 95 °C durante 10 minutos, depois 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos e anelamento em

60 °C durante 1 minuto. A especificidade dos produtos de PCR foi verificada por meio de controle das correspondentes curvas de dissociação.

As eficiências de amplificação de cada um dos genes foram calculadas usando uma curva padrão relativa de diluições em série de cDNA (1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64). Todas as amostras foram executadas individualmente, e cada experimento foi realizado em triplicata. Para assegurar condições experimentais iguais, os mesmos reagentes foram utilizados para amplificar todos os genes com ensaios aplicados concomitantemente na mesma placa de PCR.

O método utilizado para análise da quantificação relativa foi o  $\Delta\Delta CT$  (Livak and Schmittgen, 2001), na qual a quantificação dos transcritos alvo (*POU5F1*, *G6PDH* e *HSP70*) foi corrigida com base na média de quantificação dos genes endógenos *YWHAZ* e *SDHA*.

## 5.4 SISTEMAS DE CO-CULTIVO EMBRIONÁRIO

### 5.4.1 Co-cultivo com células da granulosa

Foi realizado um sistema de co-cultivo dos embriões bovinos sobre monocamada de células da granulosa, oriundas das células do *cumulus oophorus* dos oócitos, que aderiram ao fundo da placa de petri durante a maturação *in vitro*. Ao término da maturação, ou seja, no dia da fecundação e 24h antes do início do cultivo *in vitro*, o meio de maturação das gotas foi substituído por 100 $\mu$ L de meio SOF para o cultivo. Após as 24 horas de fecundação os embriões foram transferidos para estas gotas e cultivados por 7 dias.

### 5.4.2 Co-cultivo com CTAs

Para realizar o co-cultivo com CTAs, estas células foram cultivadas em meio IMDM-10% SFB e foram utilizadas entre as passagens P3 a P6. Ao

atingirem confluência entre 70-80%, foi utilizada Tripsina 0,25% (Tryple Express, Gibco) previamente aquecida a 38,5 °C. As células foram centrifugadas a 300 X g, o sobrenadante descartado e o *pellet* foi lavado em PBS e resuspendido em 200 µL de SOF-Cultivo. Foi utilizada a câmara de Neubauer, sob microscópio óptico, para realizar a contagem de células (previamente estabelecida no Experimento 1) e subsequentemente as CTAs foram plaqueadas em gotas de 100 µL de meio SOF. Após 24 horas de fecundação os embriões foram transferidos para estas gotas e cultivados por 7 dias em estufa a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar e alta umidade.

## 5.5 CONDICIONAMENTO DO MEIO DE CULTIVO EMBRIONARIO COM CTAS

O condicionamento do meio de cultivo (oriundo de uma preparação laboratorial única) foi realizado como descrito por Da Silveira *et al.*, (2012) . As CTAs bovinas foram descongeladas, cultivadas em uma garrafa de 75 cm<sup>2</sup> com meio IMDM-10% SFB até atingirem a confluência de 90% (células em P4). O IMDM foi retirado, e foram feitas duas lavagens com PBS aquecido. Em seguida foram adicionados 6 mL de SOF. O condicionamento foi feito pela incubação com as CTAs por 24 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub>.

O meio SOF condicionado pelas CTAs foi aliqotado (200 µL e 700 µL) e congelado à -20 °C, sendo descongelado e utilizado ao longo das repetições do experimento.

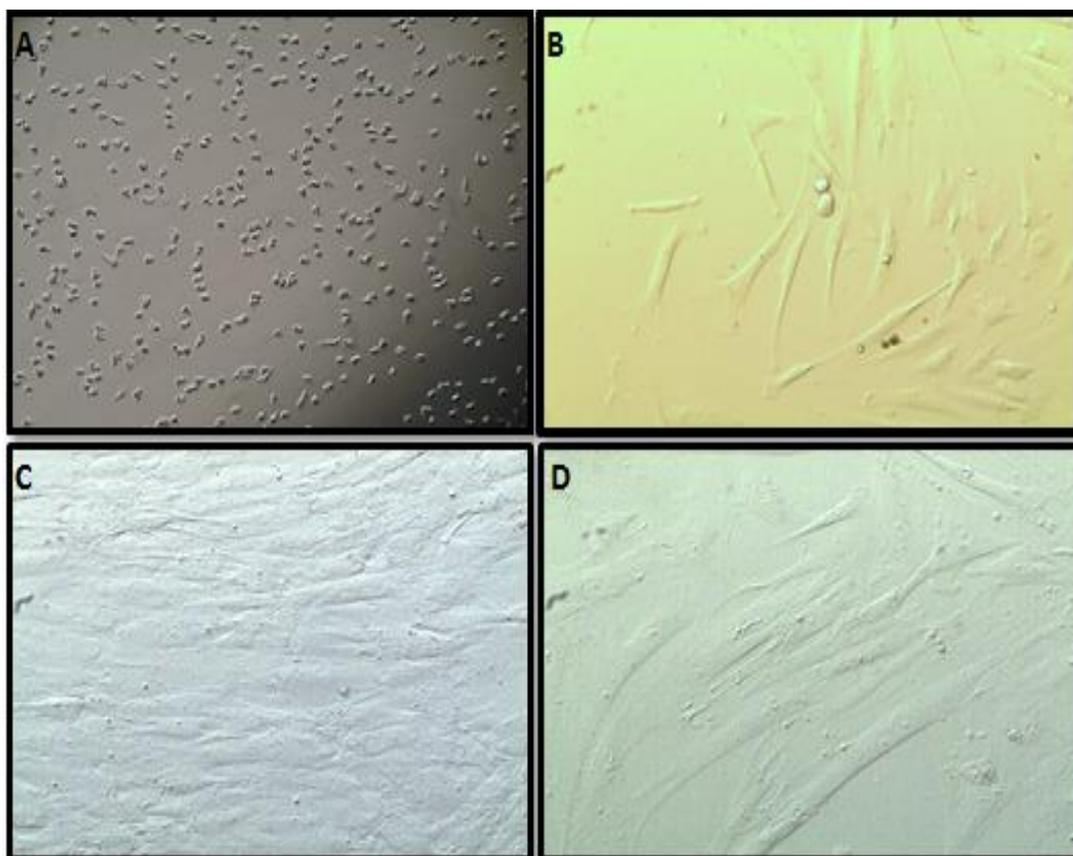
## 5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores percentuais das taxas de clivagem e blastocisto (convertidos para arcoseno e testados quando a distribuição normal), o número médio de células por embrião e a expressão média dos genes analisados foram analisados por ANOVA e Teste-t, com o pós-teste de Fisher adotando-se o nível de significância de 5%, com auxílio do programa SigmaPlot 11.0.

## 6 RESULTADOS

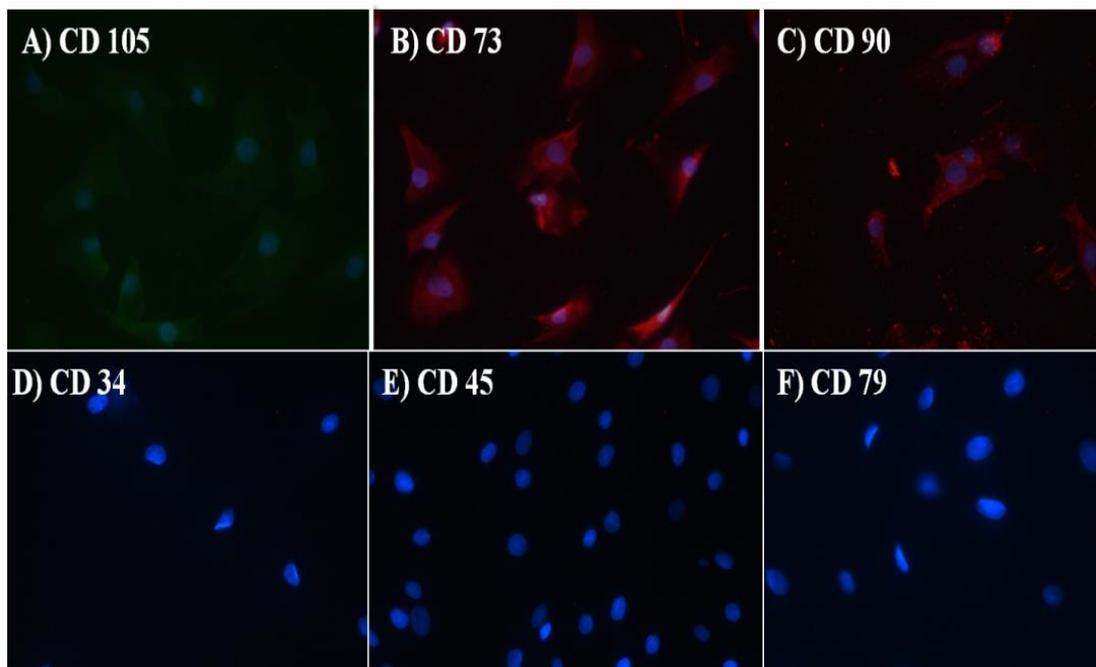
### 6.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS CTAS

Após o isolamento e plaqueamento, foi observado (Fig. 4A) que as células aderentes à superfície plástica da garrafa de cultivo apresentaram morfologia heterogênea e achatada (Fig. 4B), sendo que alguns dias após o plaqueamento, já foi possível observar células com formato semelhante a colônias de fibroblastos, proliferando-se mais rapidamente. As CTAs mantiveram esta morfologia fibroblastóide durante todo o cultivo *in vitro*, tornando-se cada vez mais uniformes com a evolução das passagens (Fig. 4C-4D).



**Figura 4:** Fotomicrografia de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo de *Bos taurus indicus*. (A) Plaqueamento após descongelamento - passagem 1 (P1)(Aumento de 100X); (B) Células aderidas em morfologia fibroblastóide inicial, após 4 dias do plaqueamento (P1); (C) CTAs na passagem 2 (P2) com monocamada em 90% de confluência; (D) CTAs na passagem 3 (P3) (Aumento de 400 x).

Através da imunocitoquímica, foi possível observar a positividade para os marcadores de superfície de células-tronco mesenquimais CD 73, CD 90 e CD 105 e a negatividade para os marcadores hematopoiéticos CD 34, CD45 e CD 79 (Figura 5).



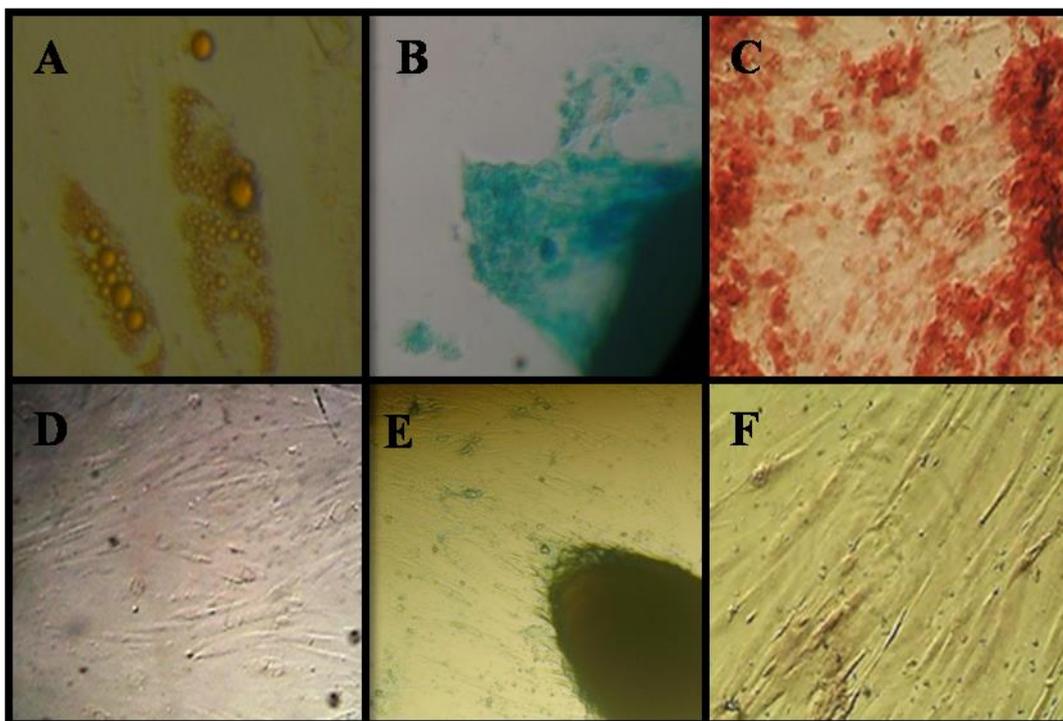
**Figura 5:** Imunofenotipagem e coloração nuclear com DAPI (Contraste nuclear clássico para microscopia de imunofluorescência) de células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo bovino. Em A, B, e C é possível observar a presença dos marcadores de células-tronco mesenquimais e em D, E e F a ausência dos marcadores hematopoiéticos (Aumento de 400x).

Para confirmação da multipotência, as CTAs foram diferenciadas na passagem P7 em Osteoblastos (coloração de células com 2% de Alizarin Red S), Adipócitos (coloração com 25% Oil Red) e Condrócitos (coloração com Alcian Blue 1%) com o kit STEMPRO Differentiation (GIBCO).

O potencial de diferenciação em linhagens mesodérmicas foi testado *in vitro*. O início das alterações morfológicas (acúmulo de lipídeos intracelulares) foi observado nas células tratadas com meio de indução adipogênico já na primeira semana de tratamento, enquanto que as células tratadas com meio de indução condrogênica e osteogênica apresentaram alterações após 10 dias,

como aglomerações celulares e depósito de cálcio, respectivamente. Estas alterações foram se intensificando com a progressão do cultivo e após 21 dias foi possível visualizar, antes da coloração, a diferenciação celular em toda a extensão da placa.

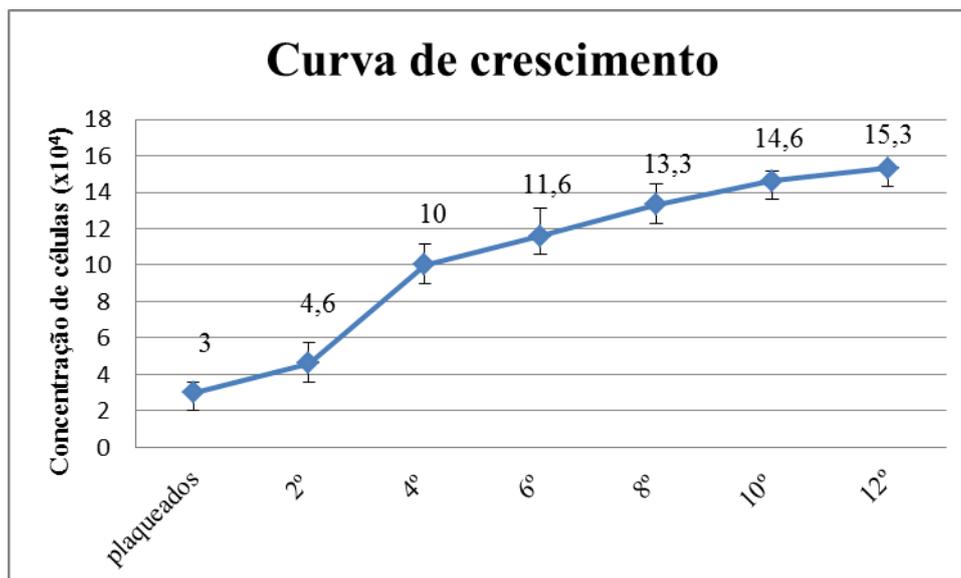
Após 21 dias de indução à diferenciação celular, observou-se nas células adipogênicas gotas intracelulares de lipídeos, as quais foram marcadas na cor vermelha quando coradas com Oil Red O (Fig. 6A-6D). As células condrogênicas, coradas com Alcian Blue, apresentaram coloração da matriz em azul, demonstrando a produção de glicosaminoglicanos (Fig. 6B-6E). A diferenciação osteogênica mostrou mineralização da matriz extracelular, a qual foi demonstrada pela deposição de cálcio quando coradas com Alizarin Red S (Fig. 6C-6F).



**Figura 6:** CTAs diferenciadas em três linhagens após 21 dias de indução. (A) Tecido adiposo: gotas lipídicas coradas com OilRed O; (B) Tecido cartilaginoso: Matriz extracelular com glicosaminoglicanos corada com Alcian Blue; (C) Tecido ósseo: Depósitos de cálcio coradas com AlizarinRed S; (D, E e F) CTAs não diferenciadas (Controle) e coradas (Aumento de 400x).

Para evidenciar o crescimento das CTAs foi possível analisar a capacidade de crescimento celular através da curva de crescimento. Neste procedimento foram quantificadas uma média de  $4,6 \times 10^4$  células no 2º dia, de  $10 \times 10^4$  células no 4º dia, de  $11,6 \times 10^4$  células no 6º dia, de  $13,3 \times 10^4$  células no

8º dia, de  $14,6 \times 10^4$  células no 10º dia e de  $15,3 \times 10^4$  células no 12º dia. É possível observar o crescimento celular na curva de crescimento da Figura 7.

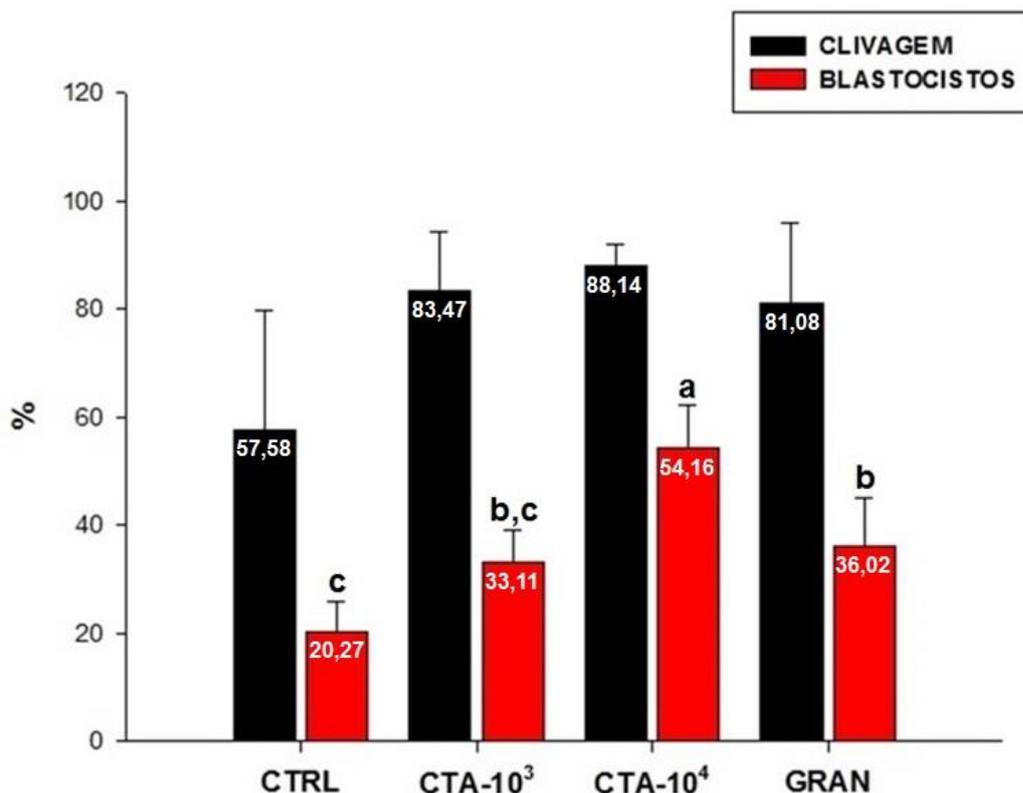


**Figura 7:** Curva de crescimento de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo bovino (4ª passagem).

## 6.2 PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES

### 6.2.1 Comparação de diferentes concentrações de CTAs no co-cultivo de embriões bovinos

Foram feitas 3 repetições, avaliando-se 4 grupos experimentais (CTRL, CTA- $10^3$ , CTA- $10^4$  e GRAN). Com relação à taxa de clivagem não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre os grupos analisados. Com relação à formação de blastocistos o grupo CTA- $10^4$  ( $n=42$ ) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção de blastocistos ( $54,16\% \pm 8,18$ ) em comparação aos grupos CTRL ( $n=44$ ;  $20,27\% \pm 5,79$ ), CTA- $10^3$  ( $n=42$ ;  $33,11\% \pm 6,06$ ) e GRAN ( $n=42$ ;  $36,02\% \pm 9,09$ ) ao final do 7º dia de cultivo. Ainda com relação à formação de blastocistos o grupo GRAN foi superior ao grupo CTRL ( $36,02\%$  vs.  $20,27\%$ ;  $p < 0,05$ ). Todos os resultados estão mostrados na Figura 8.



**Figura 8:** Clivagem e formação de blastocistos bovinos no 2º e 7º dia de cultivo respectivamente, utilizando-se diferentes quantidades de CTAs na etapa de co-cultivo *in vitro*. (Grupo CTRL, sem células no co-cultivo; Grupo CTA-10<sup>3</sup>, co-cultivo com 10.000 CTAs/mL; Grupo CTA-10<sup>4</sup>, co-cultivo com 100.000 CTAs/mL; Grupo GRAN, co-cultivo com células da granulosa; <sup>a,b,c</sup>letras diferentes indicam diferença estatística  $p < 0,05$ ).

### 6.2.2 Combinação de meio de cultivo e do tipo de célula no co-cultivo de embriões bovinos

Foram feitas 3 repetições, avaliando-se 4 grupos experimentais (CTA10<sup>4</sup>, IMDM, IMDM-G,IMDM-10<sup>4</sup>). Com relação à taxa de clivagem os grupos CTA-10<sup>4</sup> (n=57) e IMDM-10<sup>4</sup> (n=62) não diferiram entre si (77,16% vs 74,20%;  $p > 0,05$ ). Porém foram superiores ( $p < 0,05$ ) em relação aos grupos IMDM (n=63; 62,00%) e IMDM-G (n=59; 69,36%). Já em relação ao desenvolvimento posterior ao cultivo embrionário, observamos que em nenhum grupo houve desenvolvimento até o estágio de blastocisto, exceto no grupo CTA-10<sup>4</sup> que rendeu uma taxa de 37,84%, como mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2** – Cultivo *in vitro* de embriões bovinos em dois diferentes meios de cultivo (SOF e IMDM) com dois tipos de células (Granulosa e CTAs) na etapa de co-cultivo

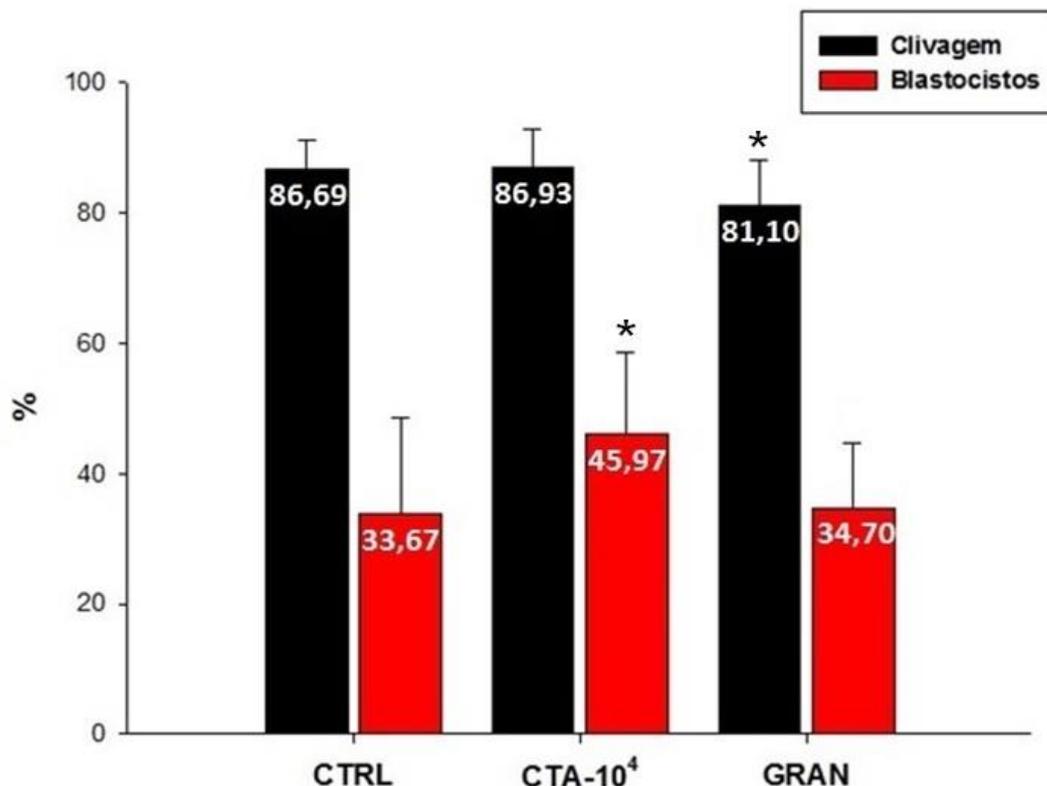
Tratamento	Zigotos	Clivagem (media ± DP)	Blastocistos (media ± DP)
<b>SOF-CTA-10<sup>4</sup></b>	57	77,16 ± 2,57 <sup>a</sup>	37,84 ± 13,37
<b>IMDM</b>	63	62,00 ± 2,96 <sup>b</sup>	-
<b>IMDM-GRAN</b>	59	69,36 ± 2,44 <sup>b</sup>	-
<b>IMDM-CTA-10<sup>4</sup></b>	62	74,20 ± 1,79 <sup>a</sup>	-

<sup>a,b</sup>Sobrescritos diferentes em uma mesma coluna diferem estatisticamente;  $p < 0,05$

SOF-CTA-10<sup>4</sup>: co-cultivo com 100.000 CTAs/mL; IMDM: meio IMDM sem co-cultivo; IMDM-GRAN: meio IMDM em co-cultivo com células da granulosa; IMDM-CTA-10<sup>4</sup>: meio IMDM em co-cultivo com 100.000 CTAs/mL.

### 6.2.3 Comparação do uso de células da granulosa e CTAs no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Foram feitas 12 repetições, avaliando-se 3 grupos experimentais (CTRL, CTA10<sup>4</sup> e GRAN). Como mostrado na Figura-9, com relação à taxa de clivagem apenas o grupo GRAN (n=231) mostrou uma pequena redução na taxa de clivagem (81,10%) em comparação ao grupo CTA-10<sup>4</sup> (n=231; 86,93%), não diferindo ( $p > 0,05$ ) do grupo CTRL (n=232; 86,69% ± 4,4). Com relação à formação de blastocistos o uso de CTAs no co-cultivo (CTA-10<sup>4</sup>) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a produção de blastocistos em comparação ao grupo utilizando células da granulosa (GRAN) e o grupo sem co-cultivo (CTRL) (45,97% ± 12,5 vs. 33,67% ± 14,7 vs. 34,70% ± 9,8; respectivamente).



**Figura 9:** Clivagem e formação de blastocistos bovinos no 2º e 7º dia de cultivo respectivamente na ausência de co-cultivo e em sistemas de co-cultivo com CTAs e com células da granulosa. (Grupo CTRL, sem células no co-cultivo; Grupo CTA-10<sup>4</sup>, co-cultivo com 100.000 CTAs/mL; Grupo GRAN, co-cultivo com células da granulosa; \* indica diferença estatística dentro de cada categoria;  $p < 0,05$ ).

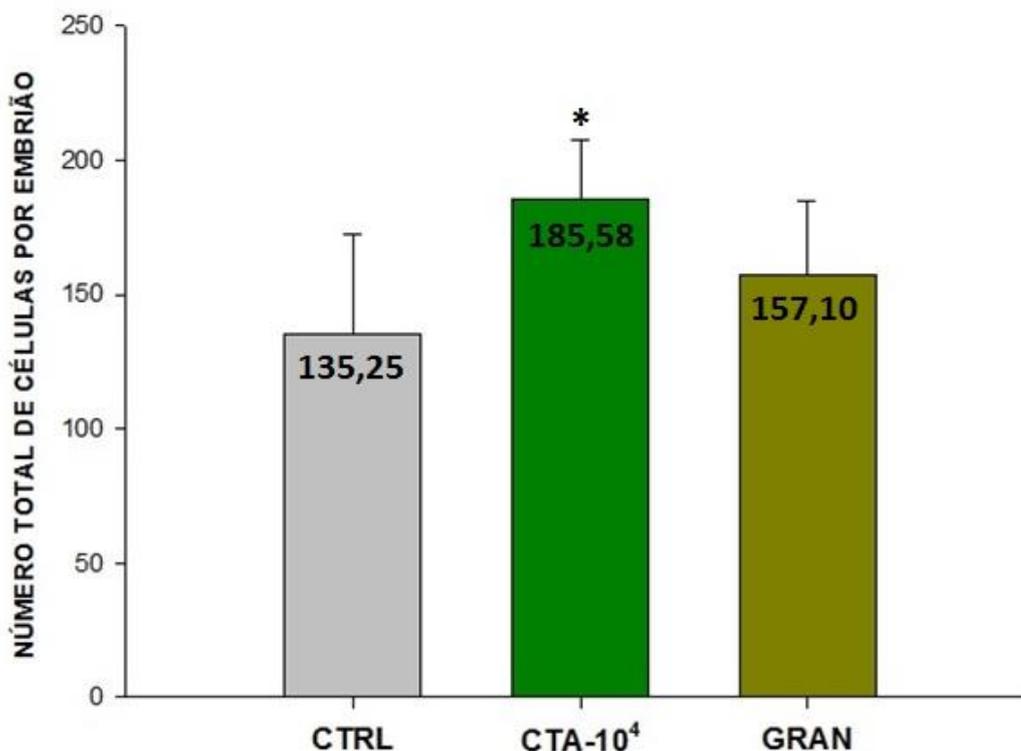
Com relação às taxas de eclosão dos blastocistos obtidos, não houve efeito do tipo de célula utilizado no co-cultivo sobre os resultados ( $p > 0,05$ ), como mostrado na Tabela 3.

**Tabela 3 -** Eclosão de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em diferentes sistemas de co-cultivo.

Tratamento	Blastocistos (n)	% Eclosão (media ± DP)
CTRL	78	24,95 ± 18,60
CTA-10 <sup>4</sup>	106	47,59 ± 31,12
GRAN	81	42,83 ± 23,90

Eclosão foi avaliada no 7º dia de cultivo. (Grupo CTRL, sem células no co-cultivo; Grupo CTA-10<sup>4</sup>, co-cultivo com 100.000 CTAs/mL; Grupo GRAN, co-cultivo com células da granulosa. Não houve diferença entre os grupos  $p > 0,05$ ).

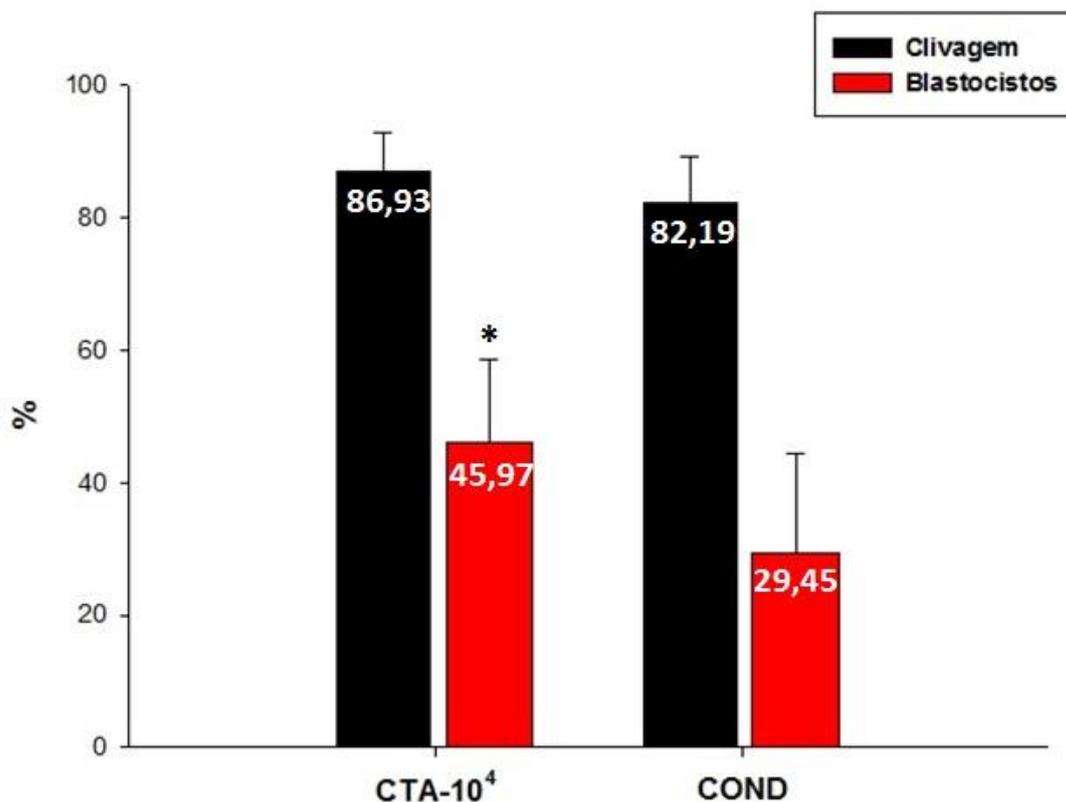
Com relação a contagem de células contidas em cada blastocisto obtido ao final do 7º dia de cultivo, o grupo CTA-10<sup>4</sup> (n=12) também foi o que apresentou o maior número médio de células por embrião (185,58 ± 21,6) em comparação aos grupos CTRL (n=8; 135,25 ± 36,98) e GRAN (n=10; 157,10 ± 27,39) (p<0,05), Figura 10.



**Figura 10:** Total de células em blastocistos bovinos produzidos *in vitro* com diferentes co-cultivos. (Grupo CTRL, sem células no co-cultivo; Grupo CTA-10<sup>4</sup>, co-cultivo com 100.000 CTAs/mL; Grupo GRAN, co-cultivo com células da granulosa. Blastocistos obtidos no 7º dia de cultivo; \* indica diferença estatística p<0,05).

#### 6.2.4 Comparação entre o co-cultivo com CTAs e o uso de meio SOF condicionado por CTAs no cultivo *in vitro* de embriões bovinos

Foram feitas 12 repetições, avaliando-se 2 grupos experimentais: CTA10<sup>4</sup> (n=231) e COND (n=231) Como mostrado na Figura 11, não houve diferença (p>0,05) entre os grupos com relação à taxa de clivagem. Porém, o uso das CTAs nas gotas de co-cultivo (grupo CTA-10<sup>4</sup>), aumentou significativamente (p<0,05) a produção de blastocistos (45,97% ± 12,55) em comparação ao uso do meio SOF previamente condicionado com CTAs (grupo COND; 29,44% ± 14,98) ao final do 7º dia de cultivo.



**Figura 11:** Clivagem e formação de blastocistos bovinos no 2º e 7º dia de cultivo em sistemas de co-cultivo com CTAs e com meio condicionado de CTAs. (Grupo CTA-10<sup>4</sup>, co-cultivo com 100.000 CTAs/mL; COND, co-cultivo com meio SOF com CTAs; \* indica diferença estatística  $p < 0,05$ ).

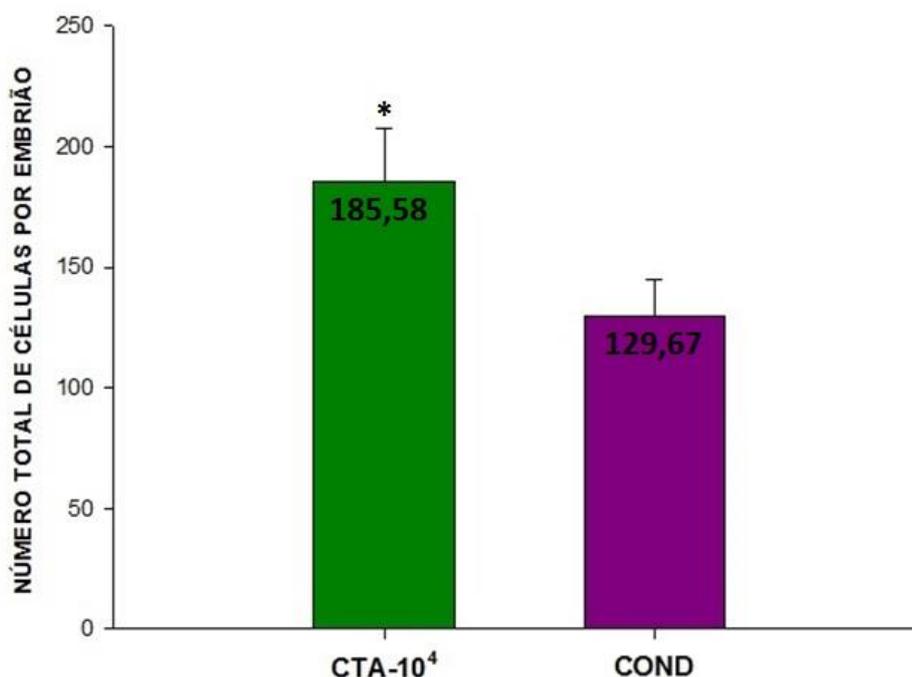
Conforme mostrado abaixo na Tabela 4, não houve diferença entre os grupos analisados ( $p > 0,05$ ) com relação às taxas de eclosão ao final do 7º dia de cultivo.

**Tabela 4 –** Taxa de eclosão de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em meio SOF previamente condicionado por CTAs ou co-cultivados em meio SOF com CTAs

Tratamento	Blastocistos (n)	% Eclosão (média ± DP)
CTA-10 <sup>4</sup>	106	47,59 ± 31,12
COND	68	31,02 ± 27,85

Grupo CTA-10<sup>4</sup> - co-cultivo com 100.000 CTAs/mL; Grupo COND: cultivo em meio SOF pré-condicionado por CTAs por 24 horas. Não houve diferença entre os grupos ( $p > 0,05$ ).

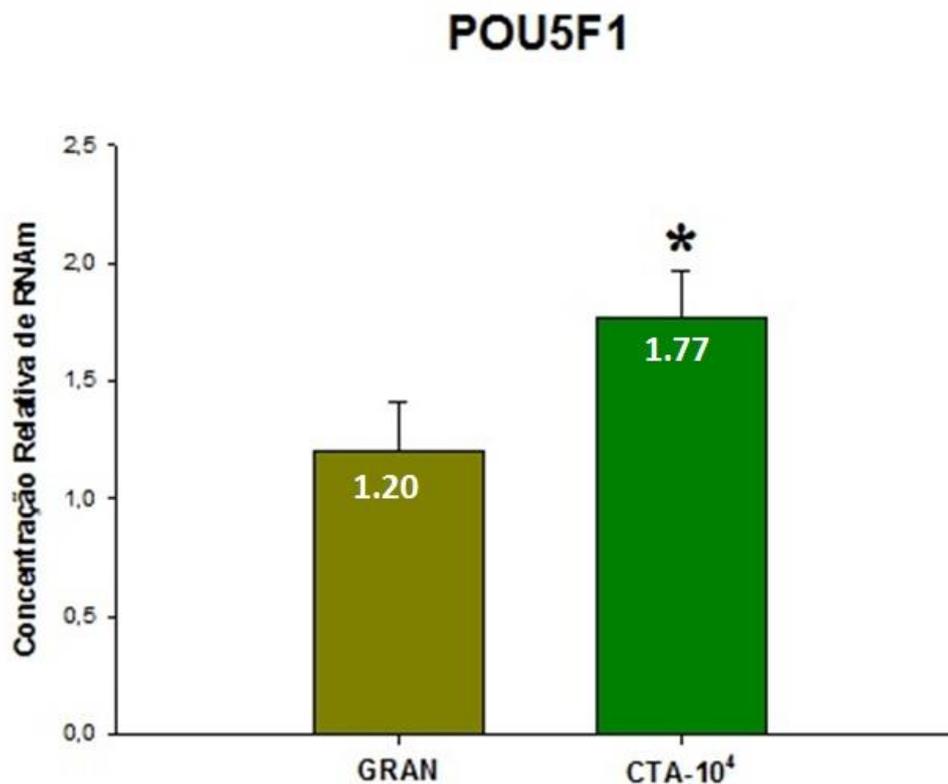
Além do aumento da produção de blastocisto, o grupo CTA-10<sup>4</sup> (n=12) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) o número médio de células por embrião em comparação ao grupo COND (n=3) ao final do 7º dia de cultivo ( $185,58 \pm 21,60$  vs.  $129,67 \pm 15,04$ ; respectivamente). Conforme mostrado abaixo na Figura 12.



**Figura 12:** Número total de células, por blastocistos bovinos produzidos *in vitro* em meio SOF previamente condicionado por CTAs ou co-cultivados em meio SOF com CTAs. Co-cultivo com 100.000 CTAs/mL (Grupo CTA-10<sup>4</sup>); Cultivo em meio SOF pré-condicionado por CTAs por 24 horas (Grupo COND); \* indica diferença estatística  $p < 0,05$ .

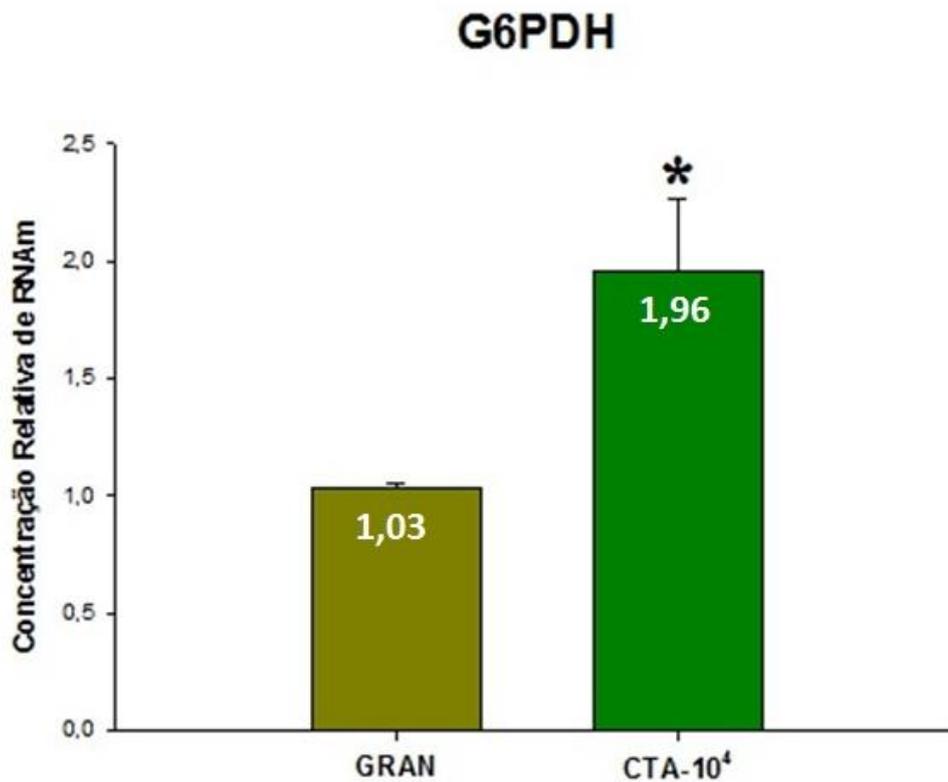
#### 6.2.5 Comparação da concentração relativa dos transcritos de *POU5F1*, *G6PDH* e *HSP70* no uso de células da granulosa e CTAs no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*

Com relação à concentração relativa dos transcritos de *POU5F1* produzidos por embriões bovinos produzidos *in vitro*, houve diferença significativa entre os embriões em co-cultivo com CTAs ( $1,77 \pm 0,19$ ) em comparação com o co-cultivo com células da granulosa ( $1,20 \pm 0,21$ ) ao final do 7º dia de cultivo, Figura 13.



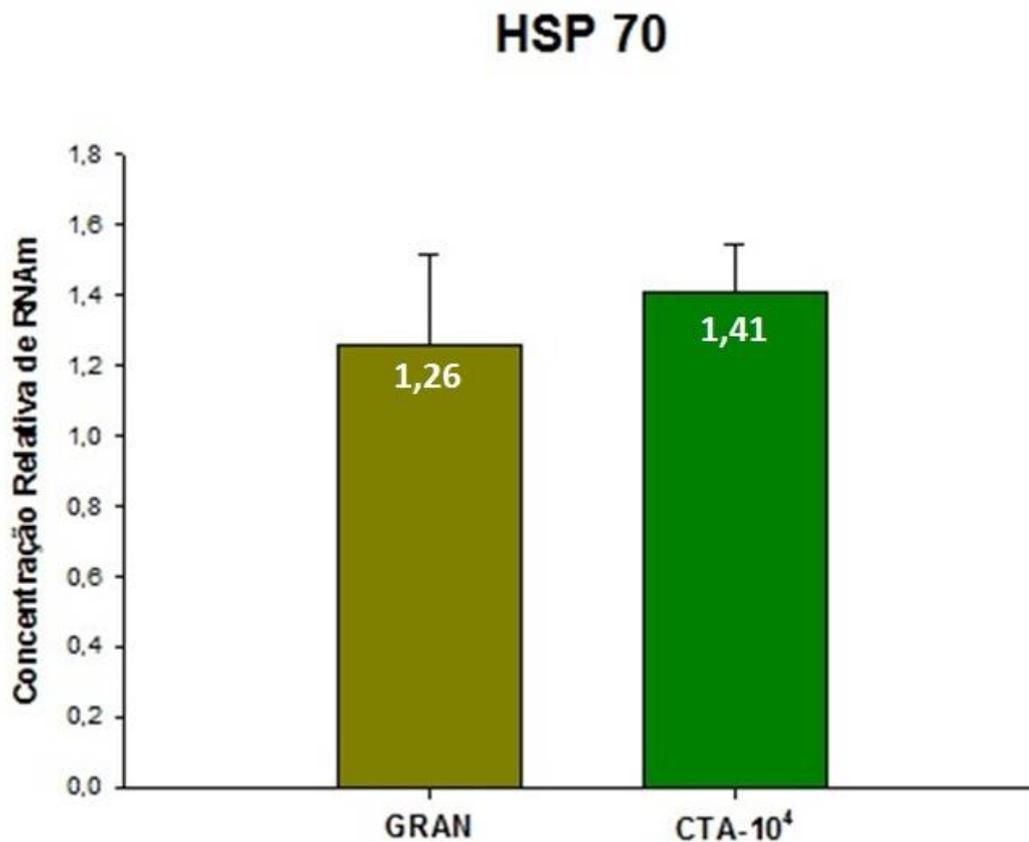
**Figura 13:** Concentração relativa dos transcritos de POU5F1 produzidos por embriões bovinos produzidos *in vitro* em co-cultivo com células da granulosa ou co-cultivo com CTAs. Co-cultivo com 100.000 CTAs/mL (Grupo CTA-10<sup>4</sup>); \* indica diferença estatística  $p < 0,05$ .

Com relação à concentração relativa dos transcritos de G6PDH produzidos por embriões bovinos produzidos *in vitro*, houve diferença significativa entre os embriões em co-cultivo com CTAs ( $1,96 \pm 0,31$ ) em comparação com o co-cultivo com células da granulosa ( $1,03 \pm 0,02$ ) ao final do 7<sup>o</sup> dia de cultivo, Figura 14.



**Figura 14:** Concentração relativa dos transcritos de G6PDH produzidos por embriões bovinos produzidos *in vitro* em co-cultivo com células da granulosa ou co-cultivo com CTAs. Co-cultivo com 100.000 CTAs/mL (Grupo CTA-10<sup>4</sup>); \* indica diferença estatística  $p < 0,05$ .

Com relação à concentração relativa dos transcritos de HSP70 produzidos por embriões bovinos produzidos *in vitro*, não houve diferença significativa entre os embriões em co-cultivo com CTAs ( $1,41 \pm 0,13$ ) em comparação com o co-cultivo com células da granulosa ( $1,26 \pm 0,26$ ) ao final do 7<sup>o</sup> dia de cultivo, Figura 15.



**Figura 15:** Concentração relativa dos transcritos de HSP70 produzidos por embriões bovinos produzidos *in vitro* em co-cultivo com células da granulosa ou co-cultivo com CTAs. Co-cultivo com 100.000 CTAs/mL (Grupo CTA-10<sup>4</sup>).

## 7 DISCUSSAO

CTAs foram originalmente descritas por Rodbell e Jones (1966) que isolaram CTAs de camundongos. Em 2001, Zuk e colaboradores isolaram e confirmaram a existência de CTAs humanas e demonstraram seu potencial de diferenciação adipogênico, osteogênico e miogênico (Zuk *et al.*, 2001; Zuk *et al.*, 2002). Neupane *et al.*, (2008) foram os primeiros a isolar e caracterizar CTAs de caninos. Células-tronco de ovinos foram obtidas através de digestão enzimática com colagenase e diferenciadas em osso, cartilagem e gordura, através de protocolo padrão (Niemeyer *et al.*, 2010). Em bovinos o primeiro relato foi de Picou (2009) que isolou gordura subcutânea utilizando o método enzimático com colágenase tipo I e mostrou que CTAs de bovinos são uma

fonte viável de células tronco somáticas que podem ser facilmente isoladas e cultivadas.

Neste estudo, de forma semelhante, fomos capazes de isolar e caracterizar a multipotência de CTMs das quais fazem parte as CTAs bovinas. A Sociedade Internacional de Terapia Celular criou requisitos mínimos para caracterizar uma célula como sendo CTMs, (Dominici, M *et al.*, 2006). Foram propostos três critérios mínimos para caracterizar CTMs: aderência às superfícies plásticas; potencial de diferenciação em osteoblastos, condrócitos e adipócitos; expressão de marcadores de superfícies específicos. Em nosso estudo todas essas características foram comprovadas uma vez que realizamos o cultivo das CTAs que demonstraram aderência à superfície das placas onde foram cultivadas, diferenciamos as CTAs em osteoblastos, condrócitos e adipócitos e mostramos que elas apresentavam os marcadores de superfície correspondentes à CTAs. Estas análises nos deram a segurança de que isolamos e cultivamos CTAs multipotentes e que estas poderiam ser utilizadas nas fases posteriores do projeto.

Uma vez garantida a multipotencialidade das CTAs isoladas, avaliamos pela primeira vez o uso direto destas células no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. Inicialmente avaliando a quantidade destas células, uma vez que baseado no trabalho pioneiro de Ling. *et al.* (2008) que usou 300.000 CTMMO/mL para formar um meio condicionado de células-tronco mesenquimais derivadas de medula óssea que mostraram efeito na maturação *in vitro* de oócitos de camundongos. Observamos que a concentração de 100.000 CTAs/mL foi melhor que a concentração de 10.000 CTAs/mL. Mostrando taxas de formação de blastocistos superiores ao grupo de embriões cultivados com células da granulosa remanescente da maturação, portanto de concentração celular indefinida. Interessante notar que em termos de crescimento celular na gota de cultivo contendo os embriões, a concentração de CTAs que mais se assemelhou a quantidade de células da granulosa foi a de 100.000 CTAs/mL, o que talvez indique que o efeito positivo das CTAs se deu mais em função do tipo celular que da concentração celular.

Quando avaliada a combinação do meio de cultivo e do tipo de célula no co-cultivo de embriões bovinos, observamos que as taxas de clivagem dos grupos contendo CTAs, independentemente do meio em que se encontravam

(SOF ou IMDM) não diferiram entre si, porém foram superiores aos grupos sem as CTAs. Com relação à formação de blastocistos observamos que em nenhum grupo houve desenvolvimento até o estágio de blastocisto, exceto no grupo com CTAs no meio de cultivo SOF. Evidenciando que os embriões bovinos produzidos *in vitro* contendo os tipos celulares analisados (granulosa e CTAs) não se desenvolvem em meio de cultivo próprio de células-tronco (IMDM).

Analisando diretamente o uso de CTAs na melhor concentração (100.000 CTAs/mL) em comparação ao co-cultivo com a granulosa e sem o co-cultivo, observamos que houve um aumento significativo da formação de blastocistos e número médio de células por embrião em comparação aos grupos sem co-cultivo e utilizando células da granulosa. Observamos ainda que o sistema de co-cultivo com CTAs induziu mudanças na expressão em dois dos três genes relacionados a aspectos da qualidade embrionária como a pluripotência (*POU5F1*), o metabolismo de carboidratos (*G6PDH*) e o estresse celular (*HSP70*).

A análise da concentração relativa dos transcritos do gene *POU5F1* mostrou diferença significativa entre os embriões bovinos produzidos *in vitro* em co-cultivo com CTAs em comparação aos do co-cultivo com células da granulosa. Por ser um regulador transcricional o gene *POU5F1* é necessário para a manutenção dos primeiros tipos de células pluripotentes em embriões e células-tronco embrionárias de mamíferos (Boyer *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 2006), sendo considerado um indicador de pluripotência (Chau *et al.*, 2002). O que nos leva a crer que os embriões produzidos no sistema de co-cultivo com CTAs (multipotentes) devem contribuir para elevar a pluripotência das recém formadas células embrionárias.

Quanto à concentração relativa dos transcritos do gene *G6PDH* ocorreu novamente diferença significativa entre os embriões bovinos produzidos *in vitro* em co-cultivo com CTAs em comparação aos embriões do co-cultivo com células da granulosa. Este fato evidencia que as CTAs potencializam o fornecimento de NADPH para a biossíntese de esteroides e ácidos graxos, como também propiciam o aumento no suprimento de ribose-5-fosfato para a síntese de nucleotídeos e ácidos nucléicos (Rieger, 1992) para o embrião que

necessita de uma ampla fonte de energia para as clivagens (mitoses) em seus estádios iniciais de desenvolvimento.

De forma interessante, foi observado um aumento do número celular total por embrião no grupo cultivado com CTAs, ou seja, o cultivo com CTAs forneceu uma melhor condição para a síntese de biomoléculas básicas demandadas por uma maior multiplicação celular.

Na análise da concentração relativa dos transcritos do gene *HSP70*, não se observou diferença significativa entre os embriões bovinos produzidos *in vitro* em co-cultivo com CTAs em comparação aos embriões do co-cultivo com células da granulosa. Como o gene *HSP70* é inibidor de apoptose celular induzida por vários fatores de estresse, através de interações com o Citocromo C (Beere *et al.*, 2000; Gurbuxani *et al.*, 2003), podemos inferir que para este gene a prevenção da morte celular é equivalente nos dois tipos celulares do co-cultivo.

De um modo geral, os resultados positivos do uso de CTAs no co-cultivo embrionário, são corroborados por diversos trabalhos que relatam as CTAs como capazes de secretar diversas moléculas solúveis, inclusive com vários estudos sobre seu secretoma. Dentre estas moléculas podemos citar fatores de crescimento e interleucinas (Rehman *et al.*, 2004; Kilroy *et al.*, 2007; J Salgado *et al.*, 2010). Ao mesmo tempo é sabido que embriões cultivados *in vitro* são responsivos a fatores secretados em meios de cultivo, ou seja, talvez a combinação destes fatores aliado a comprovada multipotência explique os resultados obtidos com o uso das CTAs em comparação as células da granulosa que são células somáticas que supostamente não possuem multipotência, ou pelo menos não há relatos na literatura, e que, portanto não possuam um secretoma tão bem estudado quanto ao das CTAs para dar suporte ao desenvolvimento embrionário.

Outra faceta muito recente das CTAs que pode estar ligada aos resultados observados é sua capacidade de secreção de exossomos, que são pequenas vesículas de 60 a 200 nm (Katsuda *et al.*, 2013), intraluminais, de corpos multivesiculares, liberadas quando se fundem com a membrana plasmática (Théry *et al.* 2009). Estas vesículas são produzidas por uma variedade de tipos celulares e podem funcionar como transmissores de mRNA,

microRNA e até proteínas (Valadi *et al.*, 2007; Kosaka *et al.*, 2010; Taylor e Gercel-Taylor, 2011).

Sendo assim, o conteúdo destes exossomos pode modular células alvo e ser responsável por este efeito parácrino das CTAs em muitas ocasiões. Inclusive há relatos de que alguns destes microRNAs contidos nos exossomas são capazes de modular a expressão de genes quando incorporados por células (Kropp, Salih e Khatib, 2014).

Na área reprodutiva, recentemente foi demonstrado que os exossomos presentes no líquido folicular modulam a maturação de células da granulosa de folículos ovarianos em crescimento (Da Silveira *et al.*, 2012).

Em nosso estudo não podemos afirmar se houve participação dos exossomos das CTAs no sentido de melhoria das taxas de produção e qualidade embrionária. Inclusive, levando-se em consideração que em nosso estudo as células alvos (embriões em crescimento) possuem uma barreira glicoproteica (zona pelúcida) que separa fisicamente os blastômeros da camada de células do co-cultivo, fica a pergunta: o efeito das CTAs ocorreu pelos exossomos ou por moléculas solúveis. Porém já foi demonstrado que a ZP possui poros (Santos *et al.*, 2008; Choi *et al.*, 2013) e que talvez o efeito das CTAs pode ter sido sim mediado por exossomos. Uma posterior caracterização deste efeito pode ser realizada uma vez que já foram descritos protocolos de isolamento destes componentes (Baglio, Pegtel e Baldini, 2012; Katsuda *et al.*, 2013).

Em termos de praticidade, a facilidade de isolamento e cultivo das células da granulosa tem levado a sua vasta utilização, porém o avanço das práticas de isolamento e cultivo das CTAs pode impulsionar seu uso no co-cultivo de embriões. De qualquer forma, buscando ainda mais a praticidade finalmente avaliamos a utilização direta de CTAs no co-cultivo com o meio SOF condicionado com CTAs no cultivo *in vitro* de embriões bovinos. O uso das CTAs nas gotas de co-cultivo aumentou significativamente a produção de blastocistos e o número médio de células por embrião em relação ao meio condicionado com CTAs ao final do 7º dia de cultivo. A utilização direta de CTMCUh no co-cultivo embrionário também aumentou de forma significativa o número médio de células por embrião em relação ao meio condicionado com CTMCUh no trabalho de (Moshkdanian *et al.* 2011).

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a presença constante das CTAs no co-cultivo é fundamental para o desenvolvimento embrionário bovino *in vitro*. Talvez os efeitos causados pelas substâncias secretadas pelas CTAs durante o condicionamento não sejam suficientes para se equiparar a utilização direta de CTAs no co-cultivo embrionário.

A tentativa de simular a presença das substâncias encontradas no secretoma das CTAs em seu condicionamento não foi bem sucedida, pois aparentemente este secretoma uma vez liberado durante o condicionamento apresenta habilidade menor de proteção contra EROs do que uma renovação constante desta secreção pelas CTAs em co-cultivo, seja através de fatores solúveis ou seja pelos exossomos. Fato também evidenciado por (Moshkdanian *et al.* 2011) em que o número de blastômeros foi menor utilizando o meio condicionado com CTMCUh do que com o co-cultivo destas células, indicando que a secreção ou adição de fatores de crescimento mostram uma menor habilidade de proteção dos embriões contra EROs do que a utilização das CTMCUh em co-cultivo.

Outra possibilidade para o insucesso do condicionamento é que talvez os embriões contribuam para a modulação das CTAs e seu subsequente secretoma e o efeito deste secretoma seja diferenciado quando as CTAs estejam em cultivo isoladas dos embriões. A existência de secreção de fatores pelos oócitos já é comprovada e pode controlar atividades das células da granulosa (Gilchrist *et al.*, 2008), como também sua diferenciação em células do cumulus ou células mural da granulosa (Li *et al.*, 2000), síntese de DNA e proliferação celular das células do cumulus (Gilchrist *et al.*, 2003; Hickey *et al.*, 2005), expansão das células do cumulus (Procházka *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2008) e apoptose das células do cumulus (Hussein *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2013).

Assim como foi reportado recentemente que embriões bovinos secretam para o meio extracelular microRNAs contidos no interior de exossomos e que podem atuar como moléculas sinalizadoras (Kropp, Salih e Khatib, 2014). Ou seja, de fato, pode ser que haja uma influência exossomal recíproca entre os embriões em crescimento e as células-tronco utilizadas como co-cultivo, fato que não ocorre quando do uso do meio condicionado, porém esta possibilidade

precisa ser posteriormente confirmada inclusive para averiguar se há uma possível mudança das CTAs do estado multi para o pluripotente.

## **8 CONCLUSÃO**

A utilização de CTAs bovinas no co-cultivo de embriões bovinos melhorou tanto a quantidade dos embriões bovinos como sua qualidade em comparação ao uso tradicional de células da granulosa, indicando que tais células podem perfeitamente substituir o uso de células da granulosa no co-cultivo *in vitro* de embriões bovinos.

## REFERÊNCIAS

ABDULRAZZAK, H. et al. Biological characteristics of stem cells from foetal, cord blood and extraembryonic tissues. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 7, n. Suppl 6, p. S689-S706, 2010. ISSN 1742-5689.

AJDUK, Anna; ZERNICKA-GOETZ, Magdalena. Quality control of embryo development. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 5, p. 903-918, 2013.

AYRES, M. et al. **Manual BioEstat 5.0**: Belém: Imprensa Oficial do Estado do Pará 2007.

AHN, Sang-Gun; THIELE, Dennis J. Redox regulation of mammalian heat shock factor 1 is essential for Hsp gene activation and protection from stress. **Genes & development**, v. 17, n. 4, p. 516-528, 2003.

BAGLIO, S. R.; PEGTEL, D. M.; BALDINI, N. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. **Frontiers in physiology**, v. 3, 2012.

BALASUBRAMANIAN, S. et al. Expression pattern of oxygen and stress-responsive gene transcripts at various developmental stages of in vitro and in vivo preimplantation bovine embryos. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 265-275, 2007.

BANKS, A. et al. Associations Between Heat Shock Protein 70 Genetic Polymorphisms and Calving Rates of Brahman-Influenced Cows. **Animal Science Arkansas Animal Science**, p. 10., 2009.

BEERE, Helen M. et al. Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. **Nature cell biology**, v. 2, n. 8, p. 469-475, 2000

BIANCO, Paolo; ROBEY, Pamela Gehron; SIMMONS, Paul J. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. **Cell stem cell**, v. 2, n. 4, p. 313-319, 2008.

BILODEAU-GOESEELS, S. Bovine Oocyte Meiotic Inhibition Before In Vitro Maturation and Its Value to In Vitro Embryo Production: Does it Improve Developmental Competence? **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 4, p. 687-693, 2012. ISSN 1439-0531.

BOYER, Laurie A. et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 947-956, 2005.

BOYER, Laurie A.; MATHUR, Divya; JAENISCH, Rudolf. Molecular control of pluripotency. **Current opinion in genetics & development**, v. 16, n. 5, p. 455-462, 2006.

BRACKETT, B. G. et al. Normal development following in vitro fertilization in the cow. **Biol Reprod**, v. 27, n. 1, p. 147-58, Aug 1982. ISSN 0006-3363 (Print) 0006-3363 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6896830> >.

BRADLEY, Allan et al. Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. **Nature**, v. 309, n. 5965, p. 255-256, 1984.

CAPLAN, Arnold I. Mesenchymal stem cells. **Journal of Orthopaedic Research**, v. 9, n. 5, p. 641-650, 1991.

CHAMBERLAIN, Giselle et al. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 2739-2749, 2007.

CHAU, Kim M.; FIRST, Neal L.; BEYHAN, Zeki. Analysis of Oct-4 gene expression in in vitro cultured bovine blastocysts. **SRP Biology**, p. 21-5, 2002.

CHAU, Kim M.; FIRST, Neal L.; BEYHAN, Zeki. Analysis of Oct-4 gene expression in in vitro cultured bovine blastocysts. **SRP Biology**, p. 21-5, 2002.

CHERRY, Anne BC; DALEY, George Q. Reprogrammed Cells for Disease Modeling and Regenerative Medicine. **Annual review of medicine**, v. 64, p. 277-290, 2013.

CHIMUTENGWENDE-GORDON, Mukai; S KHAN, Wasim. Advances in the use of stem cells and tissue engineering applications in bone repair. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 7, n. 2, p. 122-126, 2012.

CHOI, Byung-Hyun et al. Coculturing cumulus oocyte complexes with denuded oocytes alters zona pellucida ultrastructure in in vitro matured bovine oocytes. **Theriogenology**, v. 80, n. 9, p. 1117-1123, 2013.

CHOPRA, Hitesh; HANS, Manoj Kumar; SHETTY, Shashit. Stem cells-the hidden treasure: A strategic review. **Dental research journal**, v. 10, n. 4, p. 421, 2013.

DA SILVEIRA, Juliano C. et al. Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 3, p. 71, 2012.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, v. 8, n. 4, p. 315-317, 2006. ISSN 1465-3249.

EVANS, M. J.; KAUFMAN, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. **Nature**, v. 292, n. 5819, p. 154-156, 1981. ISSN 0028-0836.

FRIEDENSTEIN, A. J. et al. Osteogenic stem cells in the bone marrow. **Bone and mineral research**, v. 7, p. 243-272, 1990.

GADE, N. et al. Molecular and Cellular Characterization of Buffalo Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. **Reproduction in Domestic Animals**, 2012. ISSN 1439-0531.

GHORBANI, A., Jalali, S. A., & Varedi, M. (2014). Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: A non-enzymatic method. *Tissue and Cell*, 46(1), 54-58.

GILCHRIST, Robert Bruce et al. Comparison of oocyte factors and transforming growth factor- $\beta$  in the regulation of DNA synthesis in bovine granulosa cells. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 201, n. 1, p. 87-95, 2003.

GILCHRIST, Robert B.; LANE, Michelle; THOMPSON, Jeremy G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008.

GONÇALVES, P. B. D.; DE FIGUEIREDO, J. R.; DE FIGUEIREDO FREITAS, V. J. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. Editora Roca, 2008. ISBN 8572417443.

GOOSSENS, Karen et al. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in bovine preimplantation embryos. **BMC developmental biology**, v. 5, n. 1, p. 27, 2005.

GORDON, I. R. **Laboratory production of cattle embryos [electronic resource]: I. Gordon**. CABI, 2003. ISBN 0851996663.

GOULBURN, A. L. et al. A targeted NKX2.1 human embryonic stem cell reporter line enables identification of human basal forebrain derivatives. **Stem Cells**, v. 29, n. 3, p. 462-473, 2011. ISSN 1549-4918.

GURBUXANI, Sandeep et al. Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. **Oncogene**, v. 22, n. 43, p. 6669-6678, 2003.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Differential expression of two genes located on the X chromosome between male and female in vitro–produced bovine embryos at the blastocyst stage. **Molecular reproduction and development**, v. 55, n. 2, p. 146-151, 2000.

HICKEY, Theresa Elizabeth et al. Androgens augment the mitogenic effects of oocyte-secreted factors and growth differentiation factor 9 on porcine granulosa cells. **Biology of reproduction**, v. 73, n. 4, p. 825-832, 2005.

HUSSEIN, Tamer S. et al. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **Journal of cell science**, v. 118, n. 22, p. 5257-5268, 2005.

IBGE. Maiores efetivos bovinos municipais. 2010. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/ppm/2010/ppm2010.pdf> >. Acesso em: 05 de julho de 2013.

\_\_\_\_\_. Abate de bovinos chega a 8,5 milhões de cabeças e atinge recorde histórico no 2º trimestre. 2013. Disponível em: < <http://saladeimprensa.ibge.gov.br/noticias?view=noticia&id=1&busca=1&idnoticia=2470> >. Acesso em: 16 de setembro de 2013.

ILANCHERAN, S.; MOODLEY, Y.; MANUELPILLAI, U. Human fetal membranes: a source of stem cells for tissue regeneration and repair?. **Placenta**, v. 30, n. 1, p. 2-10, 2009.

ITO, D.; YAGI, T.; SUZUKI, N. [Progress in Induced Pluripotent Stem Cell Research for Age-related Neurodegenerative Diseases]. **Brain and nerve= Shinkei kenkyu no shinpo**, v. 65, n. 3, p. 283-288, 2013. ISSN 1881-6096.

J SALGADO, A. et al. Adipose tissue derived stem cells secretome: soluble factors and their roles in regenerative medicine. **Current stem cell research & therapy**, v. 5, n. 2, p. 103-110, 2010. ISSN 1574-888X.

JIANG, Y. et al. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. **Nature**, v. 418, n. 6893, p. 41-9, Jul 4 2002. ISSN 0028-0836 (Print) 0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12077603> >.

Jurgens, W. J. Oedayrajsingh-Varma, M. J., Helder, M. N., ZandiehDoulabi, B., Schouten, T. E., Kuik, D. J & Van Milligen, F. J. (2008). Effect of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Cell and tissue research**, 332(3), 415-426.

KANNO, Hiroshi. Regenerative therapy for neuronal diseases with transplantation of somatic stem cells. **World Journal of Stem Cells**, v. 5, n. 4, p. 163, 2013.

KARP, J. M.; LENG TEO, G. S. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. **Cell Stem Cell**, v. 4, n. 3, p. 206-16, Mar 6 2009. ISSN 1875-9777 (Electronic). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19265660> >.

KATSUDA, Takeshi et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes. **Scientific reports**, v. 3, 2013.

KILROY, G. E. et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. **Journal of cellular physiology**, v. 212, n. 3, p. 702-709, 2007. ISSN 1097-4652.

KIM, W.-S.; PARK, B.-S.; SUNG, J.-H. Protective role of adipose-derived stem cells and their soluble factors in photoaging. **Archives of dermatological research**, v. 301, n. 5, p. 329-336, 2009. ISSN 0340-3696.

KIM, E. Y.; LEE, J. B.; PARK, H. Y.; JEONG, C. J.; RIU, K. Z.; PARK, S. P. The use of embryonic stem cell derived bioactive material as a new protein supplement for the in vitro culture bovine embryos. **Journal of Reproduction and Development**. Vol 57. N3. 2011

KINGHAM, Emmajayne; OREFFO, Richard OC. Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells: Understanding, Creating, and Exploiting the Nano-Niche for Regenerative Medicine. **ACS nano**, v. 7, n. 3, p. 1867-1881, 2013.

KÖRBLING, Martin; ESTROV, Zeev. Adult stem cells for tissue repair—a new therapeutic concept?. **New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 6, p. 570-582, 2003.

KOSAKA, N.et al. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J. Biol. Chem.*285, 17442–17452 (2010).

KROPP, Jenna; SALIH, Sana M.; KHATIB, Hasan. Expression of microRNAs in bovine and human pre-implantation embryo culture media. **Frontiers in genetics**, v. 5, 2014.

LAZZARI, Giovanna et al. Cellular and molecular deviations in bovine in vitro-produced embryos are related to the large offspring syndrome. **Biology of Reproduction**, v. 67, n. 3, p. 767-775, 2002.

LEE, O. K. et al. Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. **Blood**, v. 103, n. 5, p. 1669-75, Mar 1 2004. ISSN 0006-4971 (Print) 0006-4971 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14576065> >.

LI, Rong et al. Oocyte-secreted factor (s) determine functional differences between bovine mural granulosa cells and cumulus cells. **Biology of reproduction**, v. 63, n. 3, p. 839-845, 2000.

LING, B.; FENG, D.Q.; ZHOU2, Y.; GAO1, T.; WEI3 H.M.; TIAN, Z.G. Effect of conditioned medium of mesenchymal stem cells on the in vitro maturation and subsequent development of mouse oocyte. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 41: 978-985. 2008

LOPES, Ana S. et al. Respiration rates correlate with mRNA expression of *G6PD* and *GLUT1* genes in individual bovine in vitro-produced blastocysts. **Theriogenology**, v. 68, n. 2, p. 223-236, 2007.

MACARIO, A. J.; CONWAY, de Macario E. Molecular chaperones: multiple functions, pathologies, and potential applications. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 12, p. 2588-2600, 2006.

MCCORMICK, Jennifer Blair; HUSO, Holly A. Stem cells and ethics: current issues. **Journal of cardiovascular translational research**, v. 3, n. 2, p. 122-127, 2010.

MEIRELLES, Lda S.; NARDI, Nance Beyer. Methodology, biology and clinical applications of mesenchymal stem cells. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, v. 14, p. 4281, 2009.

MENASCHÉ, Philippe et al. The myoblast autologous grafting in ischemic cardiomyopathy (MAGIC) trial first randomized Placebo-controlled study of myoblast transplantation. **circulation**, v. 117, n. 9, p. 1189-1200, 2008.

MIZUNO, H.; TOBITA, M.; UYSAL, A. C. Concise Review: Adipose-Derived Stem Cells as a Novel Tool for Future Regenerative Medicine. **Stem Cells**, v. 30, n. 5, p. 804-810, 2012. ISSN 1549-4918.

MOODLEY, Yuben et al. Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 182, n. 5, p. 643-651, 2010.

MOON, K. M.; PARK, Y. H.; LEE, J. S.; CHAE, Y. B.; KIM, M. M.; KIM 2, D. S.; KIM, B. W.; NAM, S. W. E LEE, J. H. The Effect of Secretory Factors of AdiposeDerived Stem Cells on Human Keratinocytes. **International Journal of Molecular Sciences**.13, 1239-1257; 2012

MISIRLIOGLU, M. et al. Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 50, p. 18905-18910, 2006.

MORTON, K. M. et al. Altered mRNA expression patterns in bovine blastocysts after fertilisation in vitro using flow-cytometrically sex-sorted sperm. **Molecular reproduction and development**, v. 74, n. 8, p. 931-940, 2007.

MOSHKDANIAN, G. et al. Antioxidants rescue stressed embryos at a rate comparable with co-culturing of embryos with human umbilical cord mesenchymal cells. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 28, n. 4, p. 343-349, 2011. ISSN 1058-0468.

MUNDIM, Tatiane Carmo Duarte. Estudo de genes candidatos associados ao desenvolvimento embrionário bovino em diferentes sistemas de produção de embriões. 2008.

MUMMERY, C. et al. **Stem Cells: Scientific Facts and Fiction**. Access Online via Elsevier, 2010. ISBN 0123815363.

MUSINA, R. A. et al. Endometrial mesenchymal stem cells isolated from the menstrual blood. **Bull Exp Biol Med**, v. 145, n. 4, p. 539-43, Apr 2008. ISSN 0007-4888 (Print) 0007-4888 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19110612> >.

NEUPANE, Manish et al. Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. **Tissue Engineering Part A**, v. 14, n. 6, p. 1007-1015, 2008.

NICOL, CHRISTOPHER J. et al. An embryoprotective role for glucose-6-phosphate dehydrogenase in developmental oxidative stress and chemical teratogenesis. **The FASEB Journal**, v. 14, n. 1, p. 111-127, 2000.

NIEMANN, H., and C. WRENZYCKI. "Alterations of expression of developmentally important genes in preimplantation bovine embryos by in vitro culture conditions: implications for subsequent development." *Theriogenology* **53.1** (2000): 21-34.

NIEMEYER, Philipp et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*, v. 31, n. 13, p. 3572-3579, 2010.

NOLLEN, Ellen AA; MORIMOTO, Richard I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing heat shock proteins. *Journal of cell science*, v. 115, n. 14, p. 2809-2816, 2002.

OBRADOVIĆ, Slobodan et al. Autologous bone marrow-derived progenitor cell transplantation for myocardial regeneration after acute infarction. *Vojnosanitetski preglod*, v. 61, n. 5, p. 519-529, 2004.

ONG, W. K.; SUGII, S. Adipose-derived stem cells: Fatty potentials for therapy. *The International Journal of Biochemistry e Cell Biology* **45**. 1083– 1086. 2013

PANT, Disha; KEEFER, Carol L. Expression of pluripotency-related genes during bovine inner cell mass explant culture. *Cloning and Stem cells*, v. 11, n. 3, p. 355-365, 2009.

PARK, C.; BERGSAGEL, D.; MCCULLOCH, E. Mouse myeloma tumor stem cells: a primary cell culture assay. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 46, n. 2, p. 411-422, 1971. ISSN 0027-8874.

PARK, H. Y.; KIM, E. Y.; LEE, S. E.; CHOI, H. Y.; MOON, J. J. PARK, M. J.; SON, Y. J.; LEE, J. B.; JEONG, C. J.; LEE, D. S.; RIU, K. Z. e PARK, S. P. Effect of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal-Stem-Cell Bioactive Materials on Porcine Embryo Development. *Molecular*

**Reproduction & Development.** Volume 80, Issue 12, pages 1035–1047, December 2013

PAULA-LOPES, F. F.; HANSEN, P. J. Heat shock-induced apoptosis in preimplantation bovine embryos is a developmentally regulated phenomenon. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1169-1177, 2002.

PEIPPO, Jaana et al. Sex-chromosome linked gene expression in in-vitro produced bovine embryos. **Molecular human reproduction**, v. 8, n. 10, p. 923-929, 2002.

PICOU, A.A. The Isolation and Characterization of Bovine Adult Derived Stem Cells for the Use in Nuclear Transfer. Thesis Submitted to the Graduate Faculty of the Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science In **The Interdepartmental Program of the School of Animal Sciences**, pp. 28 e 31, 2009.

PROCHÁZKA, Radek et al. Secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEF) in porcine follicles. **Molecular reproduction and development**, v. 49, n. 2, p. 141-149, 1998.

PURPERA, M. N. et al. Effects of culture medium and protein supplementation on mRNA expression of in vitro produced bovine embryos. **Molecular reproduction and development**, v. 76, n. 8, p. 783-793, 2009.

RAMOS-IBEAS, Priscila et al. An Efficient System to Establish Biopsy-Derived Trophoblastic Cell Lines from Bovine Embryos. **Biology of reproduction**, p. biolreprod. 114.118430, 2014.

REHMAN, J. et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. **Circulation**, v. 109, n. 10, p. 1292-1298, 2004. ISSN 0009-7322.

REN, Y., WU, H., MA, Y., CANG, M., WANG, R., E LIU, D. Isolation, cultivation and identification of adipose-derived stem cell in bovines. **Chinese journal of biotechnology**, v. 26, n. 12, p. 1645-1651, 2010.

Reshak, A. H., Shahimin, M. M., & Buang, F. (2013). Comparative study on human and bovine AT-SC isolation methods. **Progress in biophysics and molecular biology**, 113(2), 295-298

RIEGER, Don. Relationships between energy metabolism and development of early mammalian embryos. **Theriogenology**, v. 37, n. 1, p. 75-93, 1992.

RODRIGUEZ, A. M. et al. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Biochimie**, v. 87, n. 1, p. 125-8, Jan 2005. ISSN 0300-9084 (Print) 0300-9084 (Linking). Disponível em: <  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15733747> >.

SANTOS, P. et al. Bovine oocyte quality in relation to ultrastructural characteristics of zona pellucida, polyspermic penetration and developmental competence. **Reproduction in domestic animals**, v. 43, n. 6, p. 685-689, 2008.

SARTORI, R. et al. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. **Theriogenology**, v. 65, n. 7, p. 1311-1321, 2006. ISSN 0093-691X.

SHIMIZU, N. et al. The bovine genes for phosphoglycerate kinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, alpha-galactosidase, and hypoxanthine phosphoribosyltransferase are linked to the X chromosome in cattle-mouse cell hybrids. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 29, n. 1, p. 26-31, 1981.

SOLEYMANINEJADIAN, E.; PRAMANIK, K.; SAMADIAN, E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells: cytokines and factors. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 67, n. 1, p. 1-8, 2012. ISSN 1600-0897.

SOUZA, V. F. D. et al. Células-tronco: uma breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 2, n. 2, 2010. ISSN 2236-5222.

STEUERWALD, Nury et al. Analysis of gene expression in single oocytes and embryos by real-time rapid cycle fluorescence monitored RT–PCR. **Molecular Human Reproduction**, v. 5, n. 11, p. 1034-1039, 1999.

STRINGFELLOW, D.; SEIDEL, S. Manual da sociedade internacional de transferência de embriões: um guia de procedimento e informações gerais para uso em tecnologia de transferência de embriões enfatizando procedimentos sanitários. **Illinois: Savoy**, 1998.

Taylor, D. D. & Gercel-Taylor, C. Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. *Semin. Immunopathol.* 33, 441–454 (2011).

THÉRY, Clotilde; OSTROWSKI, Matias; SEGURA, Elodie. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 8, p. 581-593, 2009.

THOMSON, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, n. 5391, p. 1145-1147, 1998. ISSN 0036-8075.

TSAI, F. C.; GARDNER, D. K. Nicotinamide, a component of complex culture media, inhibits mouse embryo development in vitro and reduces subsequent developmental potential after transfer. **Fertility and sterility**, v. 61, n. 2, p. 376-382, 1994.

THOMSON, J. M.; STOTHARD, P.; MCNAMARA, J. P. Transcriptome profile comparison between beef and dairy adipose pooled mRNA reveals differences. In: **Energy and protein metabolism and nutrition in sustainable animal production**. Wageningen Academic Publishers, 2013. p. 469-470.

WANG, Xian-Long et al. Oocyte-secreted growth differentiation factor 9 inhibits BCL-2-interacting mediator of cell death-extra long expression in porcine cumulus cell. **Biology of reproduction**, p. *biolreprod.* 113.108365, 2013.

WANG, Q.; COONEY, A. J. The Role of Nuclear Receptors in Embryonic Stem Cells. In: (Ed.). **Transcriptional and Translational Regulation of Stem Cells**: Springer, 2013. p.287-306. ISBN 9400766203.

WEISBERG, S. P. et al. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1796-808, Dec 2003. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679176> >.

WRENZYCKI, C. et al. In vitro production and nuclear transfer affect dosage compensation of the X-linked gene transcripts G6PD, PGK, and Xist in preimplantation bovine embryos. **Biology of reproduction**, v. 66, n. 1, p. 127-134, 2002.

WU, B.; ZAN, L. Enhance beef cattle improvement by embryo biotechnologies. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 47, n. 5, p. 865-871, 2012. ISSN 1439-0531.

VALADI, H. et al. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* 9, 654–659 (2007).

VOELLMY, Richard; BOELLMANN, Frank. Chaperone regulation of the heat shock protein response. In: **Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks**. Springer New York, 2007. p. 89-99.

XU, H. et al. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, v. 112, n. 12, p. 1821-30, Dec 2003. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14679177> >.

YAMAGUCHI, Shinpei et al. < i> Nanog</i> expression in mouse germ cell development. **Gene Expression Patterns**, v. 5, n. 5, p. 639-646, 2005.

YEUNG, Telford Y. et al. Human mesenchymal stem cells protect human islets from pro-inflammatory cytokines. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e38189, 2012.

ZHANG, Xia et al. Developmental and hormonal regulation of cumulus expansion and secretion of cumulus expansion-enabling factor (CEEf) in goat follicles. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 9, p. 1387-1395, 2008.

ZHU, Y. et al. Adipose-derived stem cell: a better stem cell than BMSC. **Cell Biochem Funct**, v. 26, n. 6, p. 664-75, Aug 2008. ISSN 1099-0844 (Electronic) 0263-6484 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18636461> >.

ZUK, P. A. The adipose-derived stem cell: looking back and looking ahead. **Molecular biology of the cell**, v. 21, n. 11, p. 1783-1787, 2010. ISSN 1059-1524.

ZUK, P. A. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. **Mol Biol Cell**, v. 13, n. 12, p. 4279-95, Dec 2002. ISSN 1059-1524 (Print) 1059-1524 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12475952> >.

ZUK, P. A. et al. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. **Tissue Eng**, v. 7, n. 2, p. 211-28, Apr 2001. ISSN 1076-3279 (Print) 1076-3279 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11304456> >.