

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**USO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS UTERINAS
DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

LAÍS DO NASCIMENTO CINTRA

Botucatu - SP

Novembro – 2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**USO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS UTERINAS
DURANTE O CULTIVO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS**

LAÍS DO NASCIMENTO CINTRA

Dissertação apresentada junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal (Área de concentração: Reprodução Animal), como parte das exigências para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Adj. Fernanda da Cruz Landim

Botucatu - SP

Novembro – 2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Cintra, Lais do Nascimento.

Uso de meio condicionado por células estromais mesenquimais uterinas durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos / Lais do Nascimento Cintra. - Botucatu, 2018

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Fernanda da Cruz Landim-Alvarenga
Capes: 50504002

1. Tecnologias reprodutivas. 2. Células mesenquimais estromais.
3. Reprodução animal. 4. Bovino - Reprodução.

Palavras-chave: RT-qPCR; célula mesenquimal estromal endometrial;
cultivo embrionário; meio condicionado; suplementação.

Nome do Autor: Laís do Nascimento Cintra
Título: USO DE MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS ESTROMAIS
MESENQUIMAIS UTERINAS DURANTE O CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES
BOVINOS.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profª Drª Fernanda da Cruz Landim
Presidente e Orientadora
Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Prof. Dr. Mateus José Sudano
Membro
Departamento de Ciências Naturais e Humanas
Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. Anthony César de Souza Castilho
Membro
Departamento de Farmacologia
IBB – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 05 de novembro de 2018.

Dedicatória

Este trabalho é dedicado à minha família, meus pais Wanir e Stela e meus irmãos Lara, Lívia e Eduardo, sempre presentes, mesmo na distância...

Amo vocês!

Agradecimentos

A Deus, por colocar sua mão em cada detalhe da minha vida.

A minha orientadora Profa. Dra. Fernanda da Cruz Landim, agradeço pela orientação e confiança, por acreditar no trabalho proposto e fazer todo o possível para que ele se concretizasse.

Ao Prof. Dr. Mateus Sudano, sempre disposto em ajudar.

Ao Prof. Dr. Anthony Castilho e sua aluna Fernanda Franchi, por permitir o acesso ao seu laboratório.

Aos colegas de trabalho da Geneal, pela paciência e companheirismo. Sou muito grata à todos vocês por terem me guiado no início da minha carreira profissional.

A excelente amiga e companheira de trabalho, Guapa, por sempre estar disposta a ajudar mesmo nos períodos de trabalho de madrugada a fora. Obrigada pela amizade, sem você este trabalho não seria possível.

Aos colegas de trabalho do LANÇA, pela parceria e amizade.

Aos amigos da pós graduação, Alice, Maria Laura, Guapa, Gomides e Suzane, por compartilharem sempre os anseios e medos dessa jornada e pela amizade e companheirismo de sempre.

À Capes, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária, em especial a dona Raquel e dona Lurdes, pelos abraços e carinho de sempre. Ao Cabeça, Evandro, Edilson e Felipe, pela disponibilidade em ajudar sempre que precisei.

Aos estagiários, pela colaboração.

Aos meus pais e meus irmãos, pois mesmo indo pra qualquer lugar, Uberaba, Lexington, Botucatu, sei que tenho um local seguro e pessoas em que posso confiar.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades,
lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

LISTA DE FIGURAS

1. Produção de embriões no Brasil, de acordo com a técnica empregada, durante o período de 1995 a 2014. IVD: embriões produzidos por superovulação (*in vivo*); IVP: embriões produzidos *in vitro*.....7

1. Relative mRNA levels of various genes in blastocysts determined by RT-qPCR. (a) Relative mRNA levels of *ACSL6*, *CPT1B*, *CDX2*, *POU5F1*, *EGFR*, *IFNT2*, *PLAC8*, *HSP70* and *BAX* in Day-8 expanded blastocysts. (b) Relative mRNA levels of *ELOVL6*, *ACSL3*, *CASP3* and *VEGF* in Day-8 expanded blastocysts. Statistically significant differences are indicated: a-c, $P \leq 0.05$39

2. Day-8 expanded blastocysts were stained with Hoechst 33342 to determine the total cell number and TUNEL was performed to identify apoptotic cells. Embryos were cultured in the (a-a') BSA, (b-b') FBS and (c-c') CM groups. Scale bar 50 μm . (d) Mean total cell numbers determined by Hoechst 33342 staining. (e) Mean total apoptotic cell numbers determined by TUNEL.....41

LISTA DE TABELA

1. Primer sequences used to analyze expression of target and housekeeping genes in Day-8 expanded blastocysts.....37
2. Cleavage rates of embryos cultured in different media.....38
3. Developmental rates of embryos cultured in different media.....38
4. Total cell number and numbers of TE and ICM cells in embryos cultured in different media.....40

SUMÁRIO

RESUMO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1. Objetivo específico.....	4
CAPÍTULO 1	
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embrião.....	5
2.1.1. Importância da PIVE.....	7
2.1.2. Desenvolvimento e cultivo embrionário.....	7
2.1.3. Expressão gênica em embriões.....	11
2.1.4. Efeitos SFB no cultivo <i>in vitro</i> de embrião.....	13
2.1.5. Efeitos do BSA no cultivo <i>in vitro</i> de embrião.....	14
2.2. Células tronco (CT).....	15
2.3. Células tronco mesenquimais (CTMs).....	16
2.3.1 Células tronco mesenquimais endometriais.....	17
2.4. Meio condicionado.....	18
Referências bibliográficas.....	20
CAPÍTULO 2.....	30
Effect of Bovine Endometrial Mesenchymal Cell Conditioned Medium on Bovine Embryo Development.	
Abstract.....	30
Introduction.....	31
Material and Methods.....	33
Results.....	38
Discussion.....	41
References.....	44
Considerações finais.....	48

CINTRA, L. N. Uso de meio condicionado por células estromais mesenquimais uterinas durante o cultivo *in vitro* de embriões bovinos. Botucatu, 2018. 48p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista (Unesp).

RESUMO

As tecnologias de reprodução assistida, tais como a fertilização *in vitro* (FIV), transferência de embriões, transgenia e clonagem, ainda não tem o impacto comercial desejado devido a baixa produção embrionária. Apenas 30 a 40% dos blastocistos desenvolvidos são obtidos de oócitos após a MIV, fertilização e cultivo dos embriões, embora 80% dos oócitos maturados *in vitro* sejam fertilizados com sucesso. O soro fetal bovino (SFB) é o suplemento mais utilizado no cultivo de embriões *in vitro*, uma vez que melhora o desenvolvimento dos blastocistos. Apesar disso, sua presença está relacionada a alterações do metabolismo embrionário, perda de qualidade e indução de modificações na expressão de vários genes embrionários. Na tentativa de minimizar os efeitos deletérios do SFB, várias citocinas e fatores de crescimento têm sido acrescentados aos meios de cultivo embrionários *in vitro*, com a intenção de mimetizar as condições de cultivo *in vivo*. O presente experimento tem como objetivo avaliar e comparar os efeitos da adição do SFB e de meio condicionado por células mesenquimais estromais (MSCs) durante o cultivo embrionário. Os parâmetros analisados foram a viabilidade embrionária, apoptose e o perfil transcricional de genes relacionados à qualidade dos embriões. Não foi observado uma diferença ($P \geq 0,05$) na clivagem dos blastocistos, porém observou-se que a taxa de produção de embriões utilizando SFB no CIV foi maior ($P \leq 0,05$) quando comparada com MC, mas não diferiu ($P \geq 0,05$) do grupo produzido com BSA. A expressão relativa de mRNA para *ELOVL6* foi maior no grupo MC, para *CASP3* no grupo BSA, e para *ACSL3* e *VEGF* no grupo SFB. Em conjunto, esses dados sugerem que o MC pode ser utilizado como uma alternativa ao SFB. Observamos um perfil de expressão gênica diferente, sugerindo que o MC inibiu o aumento da expressão relativa de mRNA para *CASP3*. Ademais, o MC favoreceu o número total de células, inibiu a porcentagem de células em apoptose e produziu um embrião de melhor qualidade.

Palavras-chave: RT-qPCR, suplementação, meio condicionado, célula mesenquimal estromal endometrial, cultivo embrionário.

1. INTRODUÇÃO

A eficiência dos processos de maturação *in vitro* (MIV), fertilização de oócitos e desenvolvimento de embriões ainda é baixa. Apenas 30 a 40% de blastocistos são obtidos de oócitos após a MIV, fertilização e cultivo dos embriões, embora 80% dos oócitos maturados *in vitro* sejam fertilizados com sucesso (Mermillod et al., 1999; Sirard et al., 2006). Acredita-se que estes resultados se devem principalmente ao baixo potencial de desenvolvimento dos oócitos utilizados para a produção embrionária *in vitro* (PIVE), bem como a deficiências nos sistemas de cultivo embrionário (Hansel, 2003).

Durante a produção *in vitro* de embriões, não só a etapa de maturação é alterada de forma dramática (os oócitos imaturos são coletados do ovário em diferentes estágios de atresia ou crescimento), mas também a fertilização e a cultura são realizadas de formas muito diferente dos processos naturais. O fato de que essas etapas ocorrem fora do trato feminino tem um efeito tanto na quantidade quanto na qualidade dos embriões e prole produzidos (Van Wagtenonk-de Leeuw 2000).

De acordo com Serapião (2007), “uma das causas da baixa eficiência das biotecnias da reprodução é a expressão desbalanceada de mRNA transcritos importantes para o desenvolvimento. De fato, já foram identificados vários genes com expressão alterada em embriões bovinos produzidos *in vitro*, tais como genes ligados ao cromossomo X (*G6PD* e *PGK*; Wrenzyki et al., 2002), à apoptose e ao “stress” térmico e oxidativo (*HSP70.1*, *BAX*, *SOD* e *SOX*; Oliveira et al., 2005; Pedersen et al., 2005; Balasubramanian et al., 2007; Sagirkaya et al., 2007), ao transporte de glicose (*GLUT-3* e *GLUT-4*; Knijn et al., 2005), à comunicação celular (*CX43* e *CX31*; Rizos et al., 2002), à diferenciação (*LIF*, *LR-β*; Lazzari et al., 2002; Rizos et al., 2002), a genes “imprinted” (Moore & Reik, 1996; Young & Fairburn, 2000) e a DNA metiltransferases (Rycke et al., 2002).”

A qualidade inata do oócito é o principal fator que determina o rendimento do blastocisto, porém o ambiente de cultura *in vitro* que os embriões são expostos após a fertilização é o determinante-chave da qualidade do blastocisto (Rizos et al., 2002; Rizos et al., 2003). Existem inúmeras evidências que demonstram que o sistema de cultivo embrionário tem um efeito dramático no padrão de expressão de mRNA de vários genes importantes para o desenvolvimento embrionário e fetal. Os produtos

destes genes estão envolvidos em vários processos biológicos incluindo controle do metabolismo celular, adaptação ao stress, regulação epigenética, apoptose, compactação e formação do blastocisto e da placenta (Corcoran et al., 2006).

Nesse contexto, a Albumina Sérica Bovina (BSA) e o Soro Fetal bovino (SFB) são as fontes protéicas mais utilizadas no cultivo *in vitro* (CIV). Contudo, a BSA e o SFB são misturas complexas e indefinidas de proteínas, fatores de crescimento e peptídeos (Lim et al., 2007). Thompson (2000) demonstrou claramente que a BSA exerce um papel nutricional substancial durante o desenvolvimento embrionário, especialmente durante a compactação. Provavelmente por ser esta a proteína em maior abundância no trato reprodutivo feminino de mamíferos (Oyamada et al., 2004).

O soro fetal bovino (SFB) é o suplemento mais utilizado no cultivo de embriões *in vitro*, uma vez que melhora o desenvolvimento dos blastocistos (Crosier et al., 2004). Apesar disso, sua presença está relacionada a alterações do metabolismo embrionário, perda de qualidade e indução de modificações na expressão de vários genes embrionários (Abe et al., 2002; Rizos et al., 2003). Adicionalmente, sua utilização está correlacionada com a ocorrência de diversas anormalidades incluindo o exacerbado crescimento fetal, aumento do peso fetal e placentário, desenvolvimento anormal do sistema musculoesquelético fetal e dos vasos sanguíneos placentários (Lazzari et al., 2002; Everts et al., 2008).

As células-tronco (CT) são importantes para os organismos vivos por várias razões. No embrião humano, na fase do terceiro ao quinto dia de idade – chamado de blastocisto-, um pequeno grupo de, aproximadamente, 30 células, conhecidas como células da massa interna, dá origem a uma centena de células altamente especializadas, necessárias ao surgimento de um organismo adulto. Durante o desenvolvimento fetal, as células-tronco dos tecidos em desenvolvimento dão origem a múltiplos tipos de células especializadas, que fazem surgir o coração, pulmões, pele e outros tecidos. Após a diferenciação em tecidos adultos, tais como a medula óssea, músculos ou cérebro; uma população discreta de células-tronco faz a reposição das que foram perdidas através do uso normal, por trauma ou doença (Iglézias, 2004).

Um exemplo de CT de tecidos adultos são as células tronco mesenquimais (CTMs). As CTMs são células multipotentes que atraíram um grande interesse nos campos da medicina humana e animal devido às suas propriedades imunomoduladoras

únicas. Muitos estudos caracterizaram essas células como terapêuticas devido às suas propriedades antiapoptóticas e de autorrenovação (Stenger et al, 2015). Isso ocorre através de um processo fisiológico estreitamente regulado por uma complexa interação de citocinas e fatores de crescimento que regulam os efeitos parácrinos e o papel imunomodulador das CTMs como principal fator na regeneração de tecidos enxertados (Nauta & Fibbe, 2007). Especificamente, estas células são conhecidas por regular a resposta imune através da promoção de células T reguladoras e inibição da proliferação de células T citotóxicas (Stenger et al, 2015).

Gargett et al. (2009) relataram que as células tronco mesenquimais endometriais (eCTMs) quando cultivadas *in vitro* sofrem autorrenovação e possuem alto potencial proliferativo. É importante explorar a plasticidade destas células estromais para compreender os mecanismos de regeneração e diferenciação durante ciclos reprodutivos e de gravidez. Além disso, as células estromais uterinas podem se diferenciar em outras linhagens no endométrio que estão associadas à infertilidade (Donofrio et al., 2008). A metaplasia óssea das células estromais é encontrada no endométrio humano e é uma causa esporádica de infertilidade em humanos e cavalos (Walter et al, 2003; Lainas et al, 2004).

As eCTMs podem ter uma aplicação direta no tratamento de patologias reprodutivas que requerem um remodelamento endometrial, como a endometrite e a fibrose. No entanto, apenas alguns estudos descrevem em detalhes a presença dessas células em bovinos e, poucos, relatam uma caracterização aprofundada dessas células, o que seria de grande interesse nos tratamentos clínicos (Moraes et al., 2016).

As CTMs secretam moléculas bioativas como citocinas e fatores de crescimento que são liberados como fatores solúveis ou através de vesículas extracelulares (Ashiba et al., 2015). Esses fatores solúveis como PGE₂, INF- γ , IDO, IL-4, IL10, TGF- β e HGF entre outros, podem ser encontrados nos meios onde as CTMs foram cultivadas (De Schauwer et al., 2014).

Este meio, obtido após o cultivo das CTMs é rico em substâncias liberadas por elas, é conhecido como meio condicionado (MC). Muitos estudos têm demonstrado que o meio condicionado das CTMs mantém as propriedades de imunomodulação e potencial regenerativo das células que o produziram, tornando-se assim um grande

atrativo para a medicina regenerativa humana e veterinária por abrir a possibilidade de desenvolvimento de protocolos terapêuticos acelulares.

É conhecido que os materiais bioativos (MB) secretados pelas CTMs são benéficos na reparação tecidual e regeneração. Os primeiros a trabalharem com CT na PIVE foram Ling et al. em 2008. Estes autores utilizaram meio condicionado derivado de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de camundongos na maturação *in vitro*, relatando um aumento significativo na taxa de maturação dos oócitos.

Outra alternativa é a utilização de CTM para co-cultivo de embriões. Miranda et al. (2016) observaram um aumento na produção de blastocistos co-cultivados com 10^4 CTM-bTA quando comparado com a concentração de 10^3 CTM-bTA, SOF condicionado e SOF não condicionado. Blastocistos co-cultivados com 10^4 CTM-bTA também apresentaram um aumento no número total de células, além de um aumento relativo na expressão dos genes de pluripotência (*POU5F1*) e metabolismo de glicose (*G6PDH*), mas não afetou a expressão do marcador de estresse térmico (*HSP70*).

Nos últimos anos, genes de origem materna têm recebido forte atenção devido à importância destes para o desenvolvimento inicial do embrião. O estudo da função desses genes, e seus mecanismos regulatórios, é importante para o melhor conhecimento das bases moleculares envolvidas no desenvolvimento embrionário.

Desta forma, o objetivo geral deste experimento foi estudar e os efeitos da adição de meio condicionado por células mesenquimais estromais uterinas durante o cultivo embrionário, comparando com resultados obtidos utilizando-se SFB. Mais especificamente, testou se a hipótese de que as moléculas presentes no MC favorece o desenvolvimento embrionário.

1.1. Objetivo específico

- Investigar a viabilidade embrionária, apoptose e expressão pontual de genes relacionados à qualidade dos embriões cultivados em presença de meio condicionado por células mesenquimais estromais uterinas e de SFB.

Capítulo 1

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Produção *in vitro* de embrião

O acrônimo de PIVE significa produção *in vitro* de embriões e refere-se a uma série de procedimentos realizados em laboratório (Viana, 2012). O processo envolve as etapas de coleta dos oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e o cultivo ou co-cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos e embriões fora do útero animal (Gonçalves et al., 2008). Estes procedimentos surgiram como uma alternativa à produção de embriões *in vivo* por superovulação, também conhecida como transferência de embriões convencional (TE) (Viana, 2012). Pesquisas sobre PIVE vêm sendo realizadas no Brasil desde a década de 1980 por várias universidades e centros de pesquisa diferentes (Rubin, 2005) e gradualmente criaram uma base sólida de conhecimento na área.

A capacidade de oócitos mamíferos em maturar *in vitro* está correlacionada com a atividade ovariana, o crescimento folicular e a presença ou ausência de células do cumulus, formando o complexo cumulus-oócito (COCs), sendo esse último, necessário para o transporte de energia e o controle da maturação. A presença de células do cumulus circundando os oócitos parece ser mais importante para a maturação *in vitro* que até mesmo a atividade ovariana ou o tamanho folicular (Sato et al., 1977; Fukiu & Sakuma, 1980). Apesar disso, a maturação de oócitos advindos de folículos com vários tamanhos dependem de diferentes exigências nutricionais *in vitro*, pois estes estão em diferentes estágios de desenvolvimento (Haidri & Gwatkin, 1973).

In vitro, a etapa de fecundação consiste no momento em que o espermatozoide penetra o oócito maturo, promovendo elevações transitórias de cálcio livre intracelular, o que resulta na retomada da meiose e, posteriormente, na formação dos pronúcleos (Kupker et al., 1998). A fecundação é um processo complexo que resulta na união de dois gametas, promovendo a restauração do número de cromossomos para o começo do desenvolvimento de um novo indivíduo (Gordon, 1994). Os eventos iniciais da ativação se dividem em nucleares: retomada da meiose, transição anáfase – telófase, extrusão do segundo corpúsculo polar (CP); e citoplasmáticos, como a exocitose dos grânulos

corticais (GC), com consequente endurecimento da zona pelúcida (ZP) e bloqueio à polispermia (Liu et al., 2003).

A qualidade inata do oócito é o principal fator que determina a formação do blastocisto, porém o ambiente de cultura *in vitro* que os embriões são expostos após a fertilização é o determinante-chave da qualidade do blastocisto formado (Rizos et al., 2002; Rizos et al., 2003).

No início dos anos 90, a indústria brasileira de embriões já era substancial, e o país era o maior produtor de embriões, fora da Europa e da América do Norte. No entanto, a adoção do PIV após o ano 2000 impulsionou a indústria de embriões e, desde 2005, o Brasil responde por mais de 20% da produção mundial de embriões (Sartori et al., 2016). Em apenas cinco anos, o Brasil tornou-se o maior produtor mundial de embriões bovinos e uma referência para o uso de tecnologias de PIVE em escala comercial (Viana et al., 2012).

A atividade comercial bem sucedida da PIVE começou no Brasil em 1998-1999, e o aumento gradual da produção de embriões *in vitro* resultou em um aumento da indústria de embriões posteriormente (Viana et al., 2012). Em 2011, foi registrada no Brasil a produção de 350.762 embriões bovinos no ano, dos quais 90,7% foram produzidos *in vitro*, observando um crescimento anual na PIVE no Brasil e uma queda na produção de embriões produzidos *in vivo* (Viana, 2012). É importante ressaltar que em 2014 o Brasil foi considerado o maior produtor mundial de embriões com 366.517 unidades produzidas por ano, cerca de 70% do total mundial (IETS, 2014).

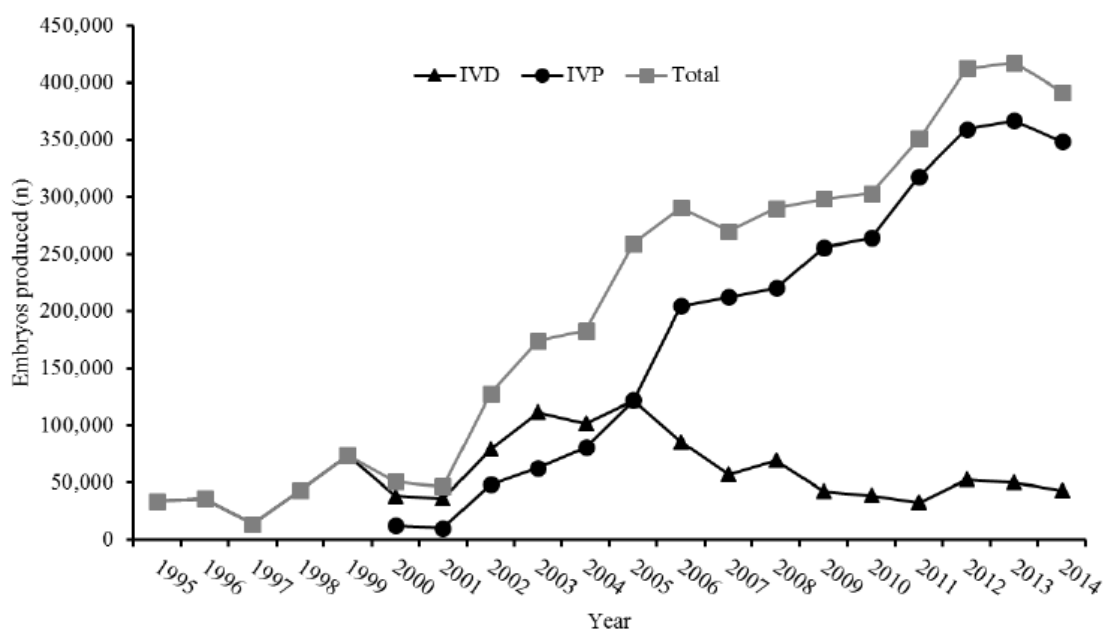


Figura 1: Fonte: Sartori et al., 2016. Produção de embriões no Brasil, de acordo com a técnica empregada, durante o período de 1995 a 2014. IVD: embriões produzidos por superovulação (*in vivo*); IVP: embriões produzidos *in vitro*.

2.1.1. Importância da PIVE

No atual contexto de evolução da produtividade na pecuária nacional, associado às evoluções científicas e tecnológicas, várias biotecnologias ligadas à reprodução animal vem sendo desenvolvidas e aprimoradas com o intuito de aumentar a eficiência reprodutiva, maximizando a produção de animais geneticamente superiores, visando o aproveitamento deste material genético para obtenção do maior número de descendentes, em um curto período de tempo (Renesto & Coelho, 2004).

Estima-se que a PIVE possa aumentar o ganho genético anual acima de 10%, quando aplicada apropriadamente, principalmente pela possibilidade de cruzamentos fatoriais, diminuindo a taxa de consanguinidade, bem como pela utilização de fêmeas pré-púberes. Além disso, com a PIVE pode-se ter uma produção maciça de animais mestiços, possibilitando a manutenção de rebanhos com a composição genética desejada, o que é impossível com o uso da monta natural e inseminação artificial (Van Arendonk & Bijma, 2003).

2.1.2. Desenvolvimento e cultivo embrionário

Durante o processo de produção *in vitro* de embriões bovinos, cerca de 90% dos oócitos são capazes de atingir a maturação nuclear (progredindo de prófase I à metáfase

II) e aproximadamente 80% dos que são fertilizados concluem pelo menos o segundo ciclo celular (Gordon, 1994), porém a eficiência dos processos de MIV, FIV e desenvolvimento de embriões ainda é baixa.

Apenas 30 a 40% dos blastocistos desenvolvidos são obtidos de oócitos após a MIV, fertilização e cultivo dos embriões, embora 80% dos oócitos maturados *in vitro* sejam fertilizados com sucesso (Mermillod et al., 1999; Sirard et al., 2006). Acredita-se que estes resultados se devem principalmente a assincronia da maturação, ao baixo potencial de desenvolvimento dos oócitos utilizados para a produção embrionária *in vitro*, bem como a deficiências nos sistemas de cultivo embrionário (Hansel, 2003).

No período de 24 a 36h após a fecundação, o zigoto contendo uma célula divide-se em dois e, 24h mais tarde, o embrião já possui quatro células. A divisão dos blastômeros pode ocorrer de forma assincrônica, razão pela qual é possível observar em estágios iniciais um número ímpar de células. Ao chegar ao estágio de 32 blastômeros, sua forma assemelha-se a uma amora, razão pela qual é denominado mórula inicial, onde sua massa ocupa quase todo o espaço perivitelínico (Palma, 2001).

No estágio de mórula compacta, o embrião, com aproximadamente 32-64 blastômeros, forma uma massa compacta que ocupa 60 - 70% do espaço perivitelínico. A compactação é considerada um dos sinais de diferenciação embrionária. Ainda assim, os blastômeros continuam com sua capacidade totipotente (Senger, 2003).

No estágio de blastocisto inicial (Bi), quando embrião possui aproximadamente 100-200 células, caracteriza-se pelo começo do transporte de fluido nas células trofoectodérmicas e pela formação de uma cavidade (blastocèle) no interior do embrião. O Bi ocupa cerca de 70 - 80% do espaço perivitelínico. Neste estágio já é possível diferenciar o trofocotoderma (TE) da massa celular interna (MCI) (Senger, 2003). O TE é o primeiro tipo celular a se distinguir, formando a camada mais externa do blastocisto que tem a função de, entre outras finalidades, iniciar o contato com o endométrio materno, propiciando a implantação (Watson & Barcroft, 2001).

O estágio de blastocisto (Bl), o embrião possui um número de células semelhante ao Bi, sendo que a blastocèle já é bem visualizada e existe uma marcada diferenciação entre as células trofoblásticas, formando uma camada que se encontra aderida à zona pelúcida (ZP) e a MCI. Já o blastocisto expandido (Bx) apresenta-se com

mais de 200 células. Seu diâmetro aumenta consideravelmente (1,2 a 1,5 vezes), e, como consequência, a ZP tem sua espessura diminuída a cerca de 1/3 da espessura inicial. A pressão crescente do blastocisto em desenvolvimento provoca a ruptura da ZP, começando assim o processo de eclosão. No estágio de blastocisto eclodido (Be), onde o número de células pode variar de 200 a 800 células, os embriões já se encontram fora da ZP, apresentando blastocele bem definida ou colabada (Senger, 2003).

Wright et al. (1976a,b) relataram a primeira expansão *in vitro* após incubação de blastocistos bovinos de 8 células. No entanto, vários pesquisadores relataram que os embriões bovinos precoces quando incubados *in vitro* não conseguiram desenvolver-se após o estágio de 8 a 16 células, enquanto os embriões cultivados no estágio de 16 células ou mais desenvolvem-se em mórula e blastocistos compactos (Thibault, 1966; Camous et al., 1984; Heyman et al., 1987).

Esta observação levou Thibault (1966) a sugerir a existência de um "bloqueio" para o desenvolvimento *in vitro* de embrião no estágio de 8 a 16 células (Rehman et al. 2001). Para First e Parrish (1987), o estágio em que o bloqueio ao desenvolvimento *in vitro* ocorre indica que (1) o oviduto contém fatores ou condições condutoras para o desenvolvimento embrionário precoce e (2) que certos eventos de desenvolvimento ocorrem entre os estágios de 1 a 16 células e requerem fatores ambientais específicos ou condições normalmente fornecidas pelo oviduto.

As proteínas mais abundantes encontradas no fluido do oviduto são a albumina e a imunoglobulina G (Leese, 1988). Assim, embriões *in vitro* de várias espécies podem ser cultivados durante o estágio de duas células com meio contendo fontes proteicas, como SFB ou BSA (Kane, 1985).

A existência do bloqueio observado por Thibault (1966) ocorre, em bovinos, em um momento de ciclo celular prolongado, síntese de DNA e durante a transição do material genético materno para o zigoto em desenvolvimento (King et al., 1985). O mecanismo de bloqueio para o desenvolvimento *in vitro* é nuclear, mas não se sabe se o meio de cultura não fornece substratos críticos para a síntese de proteínas essenciais, sinais de controle do ciclo celular ou um ambiente adequado para transcrição ou tradução (First e Parrish, 1987).

Vários métodos foram empregados para contornar este bloqueio como, por exemplo, a utilização de outros tipos celulares na co-cultura de embriões que proporcionam estímulo para o desenvolvimento dos mesmos (Rehman et al. 2001). Segundo alguns autores, a contribuição das células somáticas aos sistemas de cultivo está na produção de fatores de crescimento, como IGF-1, EGF e TGF β 1, que estimulam a proliferação de células e são importantes para a remoção de componentes inibitórios do ambiente de cultivo, que poderiam ser prejudiciais ao embrião (Mello et al., 2016).

De acordo com Rizos et al. (2003) a qualidade oocitária é um fator determinante para o desenvolvimento embrionário, entretanto o microambiente no qual os embriões são produzidos *in vitro* também influencia o desenvolvimento e a qualidade embrionária. Quando a clivagem não ocorre, não é claro se é a consequência de um espermatozóide disfuncional que não conseguiu ativar o oócito ou o próprio oócito que não teve a capacidade de sofrer a primeira divisão celular (Sirard et al., 2006).

Diversos estudos têm comparado a expressão de mRNA em embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*. No entanto, a maioria dos estudos se limita a estudar o padrão de expressão gênica em blastocistos, por ser este o momento de análise final da produção embrionária *in vitro* (Lonergan et al., 2003).

Existem também fortes indícios de que as diferenças encontradas na expressão gênica em blastocistos produzidos *in vitro*, se originam em estágios bem anteriores do desenvolvimento, em muitos casos, assim que os embriões são colocados em cultivo (Tesfaye et al., 2004). Adicionalmente as informações sobre a expressão temporal de genes envolvidos no desenvolvimento embrionário *in vitro* em diferentes sistemas de cultivo são ainda escassas.

A composição do meio de cultivo *in vitro*, utilizado nos primeiros sete dias de vida, pode influenciar o desenvolvimento embrionário, fetal e placentário em bovinos (Gilardi et al., 2004). Os efeitos da CIV são caracterizados por alterações morfológicas, histológicas, bioquímicas, moleculares e metabólicas de vários traços embrionários (Thompson, 1997; Khurana & Niemann, 2000; Kang et al., 2001; Young et al., 2001). É durante este período que o embrião passa do uso de transcritos e proteínas derivadas do genoma materno (no oócito) para aqueles resultantes do genoma embrionário recém-ativado (Memili & First 2000). A iniciação da ativação do genoma embrionário (EGA) ocorre em um tempo específico de cada espécie, no estágio de 2 células em

camundongos (Schultz, 1993), no estágio de 4 células em humanos (Braude et al., 1988) e no estágio final de 8 células em embriões bovinos (Memili & First 2000).

2.1.3. Expressão gênica

Existem inúmeras evidências que demonstram que o sistema de cultivo embrionário tem um efeito dramático no padrão de expressão de mRNA, tornando-os mais ou menos expressos, ou acarretando a ausência de expressão de genes importantes para o desenvolvimento embrionário e fetal (Wrenzycki et al., 2004, Corcoran et al., 2006). Esta fase inicial envolve várias mudanças morfológicas e bioquímicas relacionadas à atividade genômica e um conjunto complexo de processos fisiológicos, muitos dos quais ainda são desconhecidos (Gad et al., 2012).

Genes são as regiões do DNA cromossômico que estão envolvidas na produção de um produto gênico funcional. A informação nos genes é usada pela célula em duas etapas de transferência de informação: o DNA é transcrito em mRNA, que é então traduzido na sequência de aminoácidos de um polipeptídeo (Griffith et al., 2006). Segundo Fair et al. (2007) no mínimo 8000 genes são expressos em oócitos bovinos, destes foi demonstrado que 821 genes foram diferentemente expressos entre oócitos imaturos e maturados *in vitro*.

Os genes maternal antigen that embryos require (*MATER*) e zygotic arrest 1 (*Zar-1*) identificados também em oócitos imaturos humanos (Zhang et al., 2007) são exemplos de genes que participam da ativação do genoma embrionário (Wu et al., 2003). De acordo com Ariu et al. (2006), oócitos ovinos imaturos, em fase de vesícula germinativa (VG), apresentam maior nível de transcritos *Zar-1*, com marcante queda nesses valores em mórulas e blastocistos. Em bovinos, os níveis de *Zar-1* são relativamente constantes durante o desenvolvimento embrionário, com exceção no estágio de quatro células, onde um aumento significativo é observado (Brevini et al., 2004).

Estudos realizados por Knijn et al. (2002) compararam a expressão gênica de blastocistos derivados de oócitos maturados *in vivo* ou *in vitro*, e não observaram diferenças na abundância de transcritos glucose transporter 1 (*GLUT1*) e heat shock proteins (*HSP*). Suportando esta afirmação, Lonergan et al. (2003; 2006) utilizaram

oócitos provenientes de duas fontes, que diferem apenas no desenvolvimento da competência, cultivaram os prováveis zigotos sob as mesmas condições, tendo uma produção de blastocistos de qualidade similar, sugerindo que a maturação não é o principal passo no processo de PIVE que afeta a expressão gênica do embrião.

Aparentemente os genes imprinted parecem ser mais suscetíveis a alterações epigenéticas (Moore, 2001). No entanto, também foram relatadas diferenças significativas na expressão de genes não imprinted após manipulações de embriões *in vitro* (Morita et al., 1994; Koerber et al., 1998; Wrenzycki et al., 1998, 1999, 2001; Niemann & Wrenzycki, 2000). Independente do tipo de gene, qualquer um que sofra alguma alteração epigenética pode estar envolvido na aparência de fenótipos aberrantes (Bertolini et al., 2002).

A qualidade do embrião pode ser expressa por diferentes parâmetros, assim como sua morfologia, criotolerância, metabolismo e expressão gênica. O padrão de expressão de uma série de genes candidatos que regulam o desenvolvimento embrionário é um parâmetro relevante para determinar a qualidade do embrião (Dode et al., 2006) e quando este padrão está alterado, o desenvolvimento do embrião é comprometido até o estágio de blastocisto (Badr et al., 2007), proporcionando a ocorrência de fenômenos patológicos que fazem com que os embriões produzidos *in vitro* sejam desprovidos de potencial para criopreservação, transferência e implantação (Wrenzycki et al., 2004).

A primeira divisão celular (Lonergan et al., 1999), ativação do genoma embrionário (Memili & First, 1999), compactação da mórula (estabelecendo o primeiro íntimo contato entre as células no interior do embrião) (Boni et al., 1999) e a formação do blastocisto envolvendo a diferenciação de dois tipos celulares, o trofotoderma e as células da massa interna (Watson, 1992) são eventos muito importantes relacionados ao desenvolvimento embrionário que ocorrem durante a fase pré-implantacional. Apesar de ser importante o controle da expressão gênica durante esta fase, a expressão gênica no período pré-implantacional não deve ser analisada como um padrão imutável ao longo do desenvolvimento.

Alterações bioquímicas que ocorrem no embrião e no ambiente materno dependem de um balanço variável na indução e supressão dos mesmos genes ou não,

desde a passagem do oócito pelo oviduto até o momento da placentação, que é dependente da receptividade endometrial (Salilew-Wondim et al. 2012).

Embriões mais competentes em atingir uma gestação parecem ter seu perfil de expressão gênica determinado no estágio pré-implantacional, visto que apenas os embriões capazes de ativar seu genoma são capazes de se desenvolver, chegando à placentação (Betts & King, 2001). É por volta do estágio de 8 células, o embrião passa a acumular genes ativados, os quais têm como produtos fatores de transcrição, proteínas que coordenam as alterações estruturais da cromatina, além de promoverem a adesão celular e a transdução (Misirlioglu et al. 2006).

Inúmeros genes vêm sendo analisados e considerados potenciais indicadores de qualidade embrionária, dentre os quais pode-se citar genes relacionados ao reconhecimento materno da gestação: *IFN-T* e *IL1-β*; à pluripotência: *OCT4*, *SOX2*, *NANOG*; à diferenciação e implantação: *PLAC8*, *CDX2*, *GATA6*, *LIF*; ao desenvolvimento embrionário: *SOD2*, *VEGF*, *OTX2*; à adesão celular: *PKP1 e 2*, *DSC1*, *2 e 3*, *DSG1*; à apoptose: *BAX*, *BCL2*, *CASP3*; e ao metabolismo: *GLUT1 e 3*, *LEP*, *G6PD* (Heid et al. 1994; Paula-Lopes et al. 1998; Wrenzycki et al. 1998; Luo et al. 2002; Rizos et al. 2003; Clempson et al. 2011; Rickelt et al. 2011; Cebrian-Serrano et al. 2012; Hirayama et al. 2012; Kim et al. 2012; Machado et al. 2012; Ozawa et al. 2012; Sakurai et al. 2012) (apud Razza, 2017).

Mudanças no padrão de expressão gênica em embriões bovinos foram investigadas e tornou-se evidente que ela varia de acordo com o sistema de CIV utilizado (Dean et al., 1998; Wrenzycki et al., 1998, 1999; Doherty et al., 2000; Niemann & Wrenzycki, 2000).

Estudos demonstraram que o ambiente pós-fertilização altera significativamente os padrões de transcritos em embriões bovinos, com algumas diferenças evidenciadas 10 horas após o início do cultivo (Lonergan et al., 2003). A velocidade de desenvolvimento em estágio de clivagem inicial pode ser manipulada pela adição de suplementos ao meio de cultivo, particularmente o soro fetal (Rizos et al., 2003).

2.1.4. Efeitos do soro fetal bovino (SFB) no cultivo *in vitro* de embrião

O SFB pode fornecer vários fatores benéficos ao embrião, como aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento, substratos energéticos, bem como proteção contra

radicais livres, mas também pode carrear fatores embriotóxicos. A adição de soro em meios de cultivo geralmente melhora a taxa de produção de blastocisto (Gomes & Diez, 2000) e seu efeito tem caráter bifásico; ou seja, inibe as primeiras divisões celulares, mas estimula o desenvolvimento embrionário posterior (Camargo et al., 2002).

Embriões cultivados em presença de soro apresentaram acúmulo de lipídeos citoplasmáticos, os quais são responsáveis por uma maior sensibilidade desses embriões a processos de criopreservação (Abe et al., 2002; Rizos et al., 2003). O SFB pode aumentar a proporção de embriões masculinos (Gutiérrez-Adan et al., 2001), causar alterações no metabolismo (Khurana & Niemann, 2000), diminuir a densidade de organelas (Crosier et al., 2000), alterar a estrutura mitocondrial (Farin et al., 2001) e aumentar a incidência de apoptose (Knijn et al., 2003).

A utilização do SFB está correlacionada com a ocorrência de diversas anormalidades incluindo a síndrome do bezerro gigante (LOS), aumento no tamanho do coração e do fígado (Sinclair et al., 1997), lesões cerebrais (Schmidt et al., 1996), hidroalantoides (Van Wagtenonk-de Leeuw, et al., 1998) e desenvolvimento anormal dos vasos sanguíneos placentários (Lazzari et al., 2002; Everts et al., 2008).

A suplementação proteica com SFB é benéfica ao desenvolvimento oocitário e embrionário *in vitro*. No entanto, impossibilita investigar as necessidades nutricionais do oócito e do embrião durante as fases de desenvolvimento, pois o SFB é composto por uma variedade de substâncias ou componentes indefinidos, com concentrações variáveis dependendo do lote, remessas e fornecedores (Van Wagtenonk-de Leeuw et al., 2000).

Além disso, por ser, de origem animal, proveniente do fluido formado pela coagulação sanguínea de bovinos, o SFB pode introduzir uma série de componentes patogênicos nos sistemas de cultivo (Bavister et al., 1992; Krisher et al., 1999; Han & Niwa, 2003).

2.1.5. Efeitos da albumina sérica bovina (BSA) no cultivo *in vitro* de embrião

Assim como o SFB, o BSA é uma das fontes proteicas mais comumente utilizadas como suplemento do meio de cultura para produção *in vitro* de embriões bovinos, já que possui efeitos benéficos durante o desenvolvimento embrionário (Mingoti, 2000).

A principal função da albumina é atuar como transportadora. Suas propriedades ligantes, como proteína de transporte, incluem afinidades por ácidos graxos, metais e íons, bem como hormônios (Hirayama et al, 1990; Carter e Ho, 1994). Devido a sua propriedade de ligação, o BSA, protege contra componentes tóxicos presentes nos meios de cultura (Flood & Shirley, 1991), possuindo a capacidade de quelar metais pesados e equilibrar o pH (Mehta & Kiessling, 1990). Ainda, pela propriedade surfactante, previne adesão de células a superfícies plásticas e de vidro (Bavister, 1981; Pinyopumintr & Bavister, 1994).

2.2. Células tronco (CT)

Células tronco (CTs) são células indiferenciadas e não especializadas, que têm a capacidade de se multiplicarem diversas vezes dando origem a outras células indiferenciadas e ainda originar células já diferenciadas precursoras de um determinado tecido. Esta característica é definida como a capacidade de realizar divisões assimétricas (Zago & Covas, 2006), onde uma célula mãe gera duas células filhas, sendo que uma permanece idêntica e mantém o pool de células multipotentes, enquanto a outra se torna precursora de células especializadas de um determinado tecido (Baksh et al., 2004).

Após a fecundação, é formada a primeira célula tronco do organismo vivo, ou zigoto. Com o início da clivagem se formam as células totipotentes, que são capazes de se diferenciar em todos os tecidos embrionários e placentários, permanecendo com essa característica até o estágio da mórula com 8 blastômeros (Wobus, 2005). A medida que as células vão se multiplicando, elas acabam se especializando e, conseqüentemente, restringindo a sua capacidade de diferenciação (Zago & Covas, 2006). Desta forma, as células presentes na massa celular interna de blastocistos são definidas como pluripotentes, já que podem dar origem a todos os tecidos do indivíduo, com exceção de alguns tecidos placentários (Zago & Covas, 2006).

Existem três tipos de células tronco as quais são classificadas quanto sua natureza em: célula tronco embrionária (CTE), célula tronco de tecidos adultos (CTA) e a Célula Tronco de Pluripotência Induzida (iPS).

As CTEs são divididas em Pluripotentes, obtidas a partir da massa celular interna do blastocisto, podendo originar tecidos das três camadas germinativas:

endoderma, mesoderma e ectoderma (Bethesda, 2009b) e Totipotentes originadas do ovo ou zigoto, capazes de originar todos os tecidos, incluindo placenta e anexos embrionários (Zago & Covas, 2006)

Já as CTAs possuem um extraordinário potencial para se desenvolver em diversos tipos celulares do organismo, durante toda fase de vida do indivíduo, se dividindo quando necessário para reparar possíveis danos (Bethesda, 2009a). Ao sofrerem uma reprogramação genética artificial as CTAs podem passar a expressar marcadores de superfície de CTEs, sendo denominadas assim iPS (Takahashi & Yamanaka, 2006).

2.3. Células tronco mesenquimais (CTMs)

CTMs são células não diferenciadas, multipotentes, com propriedades imunomodulatórias e regenerativas, o que as torna atraentes para a utilização no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias (Dominici et al., 2006). Essas células são consideradas de fácil isolamento devido a habilidade de aderir ao plástico ou vidro durante o cultivo, apresentam uma morfologia fibroblastóide e possuem a capacidade de se multiplicar por várias passagens sem sinal de senescência celular (Zago & Covas, 2006).

Apesar das CTMs originarem-se da medula óssea, elas são circulantes, passando por órgãos e tecidos quando estes necessitam de reparos (Caplan e Sorrell, 2015). Segundo Campagnoli et al. (2001), In't Anker et al. (2003), Nakahara et al. (1991), Zuk et al. (2002), as CTMs podem ser isoladas de vários locais diferentes incluindo medula óssea, tecido adiposo, líquido amniótico, periósteo e tecido fetal, e mostram heterogeneidade fenotípica (apud Chamberlain et al., 2007).

De acordo com a “Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT)”, as células devem apresentar 3 critérios mínimos para serem consideradas CTMs nos humanos. Durante o cultivo são capazes de aderir ao plástico, é necessário a expressão dos marcadores de superfície CD105, CD73 e CD90, e ausência do CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79 ou CD19 e MHCII, além de serem capazes de se diferenciar *in vitro* em osteoblastos, condroblastos e adipócitos (Dominici et al., 2006).

Sabe-se que através da liberação de fatores solúveis, como PGE2, INF- γ , IDO, IL-4, IL10, TGF- β e HGF entre outros, as CTMs inibem a proliferação de linfócitos T e

B, inibem a diferenciação de monócitos em células dendríticas maduras, induzem as células T a expressarem fenótipo regulatório e inibem a proliferação e a citotoxicidade das células natural killers (NK) promovendo assim a modulação da resposta inflamatória (De Schauwer et al., 2014). Além disso, as CTMs são capazes de diminuir a formação de tecido cicatricial, inibir a apoptose e secretar fatores tróficos que levam a replicação das células progenitoras nos tecidos lesados (Caplan e Sorrell, 2015).

2.3.1 Células tronco mesenquimais endometriais

Sabe-se que o endométrio consiste em células epiteliais luminal e glandular, fibroblastos estromais, células musculares lisas vasculares, células endoteliais e leucócitos, formando camadas basais e funcionais. O tecido endometrial é um tecido altamente regenerativo e contém células tronco endometriais que são dinâmicas e possuem capacidade de crescimento e diferenciação durante o ciclo estral e gravidez em vacas (Donofrio et al., 2008). A presença de CTMs endometriais (eCTMs) foi descrita em outros mamíferos, como humano (Gargett et al., 2015), porco (Miernik e Karasinski, 2012), ovinos (Letouzey et al., 2015) e ratos (Chan e Gargett, 2006) (apud Moraes et al., 2016).

Estudos como os de Li et al. (2010) e Santamaria et al. (2011) indicam que os fibroblastos do tecido endometrial diferenciados *in vitro* têm propriedades funcionais *in vivo*. As eCTMs diferenciaram-se em linhagens pancreáticas endodérmicas *in vivo* e *in vitro*, produziram células diferenciadas que secretam insulina e expressam células β pancreáticas, além de células produtoras de glucagon. O xenotransplante dessas células diferenciadas em um modelo de rato imuno-comprometido com diabetes reduziu a hiperglicemia e a insulina humana foi detectada no soro do rato. Assim, os fibroblastos do tecido endometrial também mostram um potencial de diferenciação através dos limites da linhagem embrionária (Gargett et al., 2015).

Moraes et al. (2017) fizeram uma análise proteômica de eCTMs cultivadas *in vitro* e estimuladas, ou não, com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano. Várias proteínas pertencentes ao sistema imunológico, processos angiogênicos, antioxidante e de reparo tecidual foram encontradas no grupo tratado, o que permite inferir que esse modelo *in vitro* de estimulação com LPS bacteriano de eMSC bovina também é eficaz para estudar a resposta imune e inflamatória.

2.4. Meio condicionado

Para que um organismo multicelular funcione deve haver comunicação entre suas células de forma a elas colaborem entre si. Esta comunicação é mediada por moléculas-sinal extracelulares que são recebidas por proteínas receptoras ao se ligarem a eles. Isso ativa vias intracelulares de sinalização, que são compostas por pequenas moléculas sinalizadoras e proteínas sinalizadoras intracelulares. Estes fatores de comunicação podem ser fatores solúveis ou estarem contidos em vesículas extracelulares (EVs).

As EVs são subdivididas em microvesículas (MVs) e exossomos, e estão presentes virtualmente em todos os fluidos corporais, como saliva, sangue, urina, entre outros (Raposo & Stoorvogel, 2013). Estas EVs carregam mensagens contendo diversas moléculas como lipídeos, proteínas, e RNAs não codificadores (Janas et al., 2015). A partir da descoberta que os mRNA e microRNAs contidos nestas vesículas podem ser traduzidos, exercer efeito regulatório e até mesmo produzir proteína funcional na célula receptora (Valadi et al., 2007), uma enorme quantidade de estudos estão sendo realizados para entender a função destas vesículas.

As CTMs liberam diversas vesículas com origem no sistema endosomal ou na membrana plasmática (Huang et al. 2013). Estudos recentes sugerem que alguns dos efeitos regenerativos das CTMs podem ser mediados também através destas VEs. As MVs possuem algumas propriedades estruturais e funcionais semelhantes as de CTMs na regeneração de tecidos, parecendo razoável assumir que as MVs derivadas de CTMs poderia apresentar propriedades regenerativas (Kim et al., 2012; Lange-Consiglio et al., 2013). Da mesma forma, Lötvall e colaboradores (2014) demonstraram que o soro fetal bovino contém EVs, e estas podem afetar a fisiologia das células cultivadas na sua presença, uma vez que as vesículas contidas no SFB são endocitadas pelas células em cultivo.

Durante o cultivo *in vitro*, as células liberam inúmeros fatores de comunicação celular. Desta forma, o meio condicionado (MC) é composto pelo meio de cultivo e todo o secretoma produzido pelas células nesse período, ou seja, pela secreção de proteínas como principal meio de comunicação entre células e participante ativo de processos fisiológicos (Skalnikova, 2013). Durante o cultivo de CTMs já foi comprovada a secreção de fatores de crescimento, citocinas, componentes da matriz

extracelular, prostaglandina e diversas substâncias com atividade imunomoduladora e anti-inflamatória (Al Delfi et al., 2016). Sendo assim, CTMs secretam biomateriais que são benéficos na reparação tecidual e regeneração.

Os primeiros a trabalharem com CT na PIVE foram Ling et al. em 2008. Eles utilizaram meio condicionado derivado de células tronco mesenquimais da medula óssea (CTM-MO) de camundongos na maturação *in vitro*, relatando um aumento significativo na taxa de maturação dos oócitos. O que indica que a utilização de MC na MIV é mais efetivo para o crescimento folicular e maturação oocitária em camundongos.

Biomateriais enriquecidos com fatores de crescimento e citocinas são uma nova alternativa de suplemento que pode melhorar o desenvolvimento dos embriões suínos tanto na FIV quanto durante a partenogênese (Park et al., 2013). Kim et al. (2011) utilizaram MC derivado de células tronco embrionárias humanas provenientes de material bioativo na CIV de embriões bovinos. Porém não se pode dizer que o aumento na taxa de clivagem e de produção de blastocisto foi devido à suplementação do meio de cultivo embrionário com o MC.

Park et al. (2013) usaram materiais bioativos oriundos de células tronco mesenquimais de tecido adiposo humano (CTM-hTA) no meio de cultivo de embriões de suínos. Os embriões partenogênicos tiveram maior taxa de produção de blastocistos e maior quantidade de células, quando cultivados a partir do dia 4 com 10% de MB-CTM-hTA. Assim como nos embriões de FIV, a taxa de eclosão no dia 7 é mais alta nos embriões cultivados com 10% de MB-CTM-hTA do que com SFB.

Outra alternativa é a utilização de CTM para co-cultivo de embriões. Miranda et al. (2016) observaram um aumento na produção de blastocistos co-cultivados com 10^4 CTM-bTA quando comparado com a concentração de 10^3 CTM-bTA, SOF condicionado e SOF não condicionado. Blastocistos co-cultivados com 10^4 CTM-bTA também apresentaram um aumento no número total de células, além de um aumento relativo na expressão dos genes de pluripotência (*POU5F1*) e metabolismo de glicose (*G6PDH*), mas não afetou a expressão do marcador de estresse térmico (*HSP70*).

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems using serum-free or serum-containing media. *Molecular Reproduction and Development*. **61**, 57-66. doi: 10.1002/mrd.1131
- Al Delfi, I. R., Sheard, J. J., Wood, C. R. et al. (2016). Canine mesenchymal stem cells are neurotrophic and angiogenic: An *in vitro* assessment of their paracrine activity. *Veterinary Journal*. **217**, 10–17. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.09.003
- Ariu, F., Bebbere, D., Succu, S., Tore, S., Bogliolo, L., Fois, S. (2006). Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (*Zar1*) gene in ovine oocytes and pre-implantation embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. **19**, 245-245. <https://doi.org/10.1071/RDv19n1Ab258>
- Ashiba, K., Terunuma, A., Terunima, H., Takane, T., Deng, X., Yamashita, Y., Watanabe, K. (2015). Immortalized mesenchymal stem cells producing conditioned medium in a large scale for therapeutic useage. *Inflamm. Regen.* **35**, 57–60. <https://doi.org/10.2492/inflammregen.35.057>
- Badr , H., Bongioni, G., Abdoon, A .S. S., Kandil, O., Puglise, R. (2007). Gene expression in the *in vitro* produced pre-implantation bovine embryos. *Zygote*. **15**, 355-367. doi: 10.1017/S0967199407004315
- Baksh, D.; Song, L.; Tuan, R. S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of cellular and molecular medicine*. **8**, 301–16. pmid: 15491506
- Bavister, B. D. (1981). Substitution of a synthetic polymer for protein in a mammalian gamete culture system. *The Journal of Experimental Zoology*. **217**, 45-51. doi: 10.1002/jez.1402170106
- Bavister, B. D., Rose-Hellekant, T. A., Pinyopummintr, T. (1992). Development of *in vitro* matured / *in vitro* fertilized bovine embryos into morula and blastocysts in defined culture media. *Theriogenology*. **37**, 124- 46. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(92\)90251-L](https://doi.org/10.1016/0093-691X(92)90251-L)
- Bertolini, M., Beam, S. W., Shim, H., Bertolini, L. R., Moyer, A. L., Famula, T. R., Anderson, G. B. (2002). Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day 7 and 16 bovine embryos. *Molecular Reproduction And Development*. **63**, 318-328. doi: 10.1002/mrd.90015
- Bethesda, M. D. (2009a). Stem cell Basics: Introduction. In: *Stem Cell Information*, National Institutes of Health, U.S. Department of Helth and Human Services.
- Bethesda, M. D. (2009b). Stem cell Basics: What are embryonic stem cells?. In: *Stem Cell Information [World Web Site]*, National Institutes of Health, U.S. Department of Helth and Human Services.
- Betts, D.H., and King, W.A. (2001). Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology*. **55**, 171-91. pmid: 11198081
- Boni, R., Tosti, E., Roviello, S.; Dale, B. (1999). Intracellular communication in *in vivo* and *in vitro*-produced bovine embryos. *Biology of Reproduction*. **61**, 1050–1055. <https://doi.org/10.1095/biolreprod61.4.1050>
- Braude, P., Bolton, V., Moore, S. (1988). Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature*. **332**, 459-461. doi: 10.1038/332459a0

- Brevini, T. A., Cillo, F., Colleoni, S., Lazzari, G., Galli, C., Gandolfi F. (2004). Expression pattern of the maternal factor zygote arrest 1 (*Zar1*) in bovine tissues, oocytes, and embryos. *Mol Reprod Dev.* **69**, 375-80. DOI: 10.1002/mrd.20140
- Camargo, L. S. A.; Sá, W. F.; Ferreira, A. M.; Viana, J. H. M.; Araújo, M. C. C. (2002). Taurina no desenvolvimento de embriões bovinos fecundados *in vitro*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* **54**, 396-404. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352002000400011>
- Camous, S., Heyman, Y., Méziou, W., Menezo, Y. (1984). Cleavage beyond the block stage and survival after transfer of early bovine embryos cultured with trophoblastic vesicles. *J. Reprod. Fertil.* **72**, 479-485. pmid: 6512770
- Caplan, A.I., Sorrell, J. M. (2015). The MSC curtain that stops the immune system. *Immunology Letters.* **168**, 136-139. doi: 10.1016/j.imlet.2015.06.005
- Carter, D.C. and J.X. Ho. (1994). Structure of Serum-Albumin. *Advances in Protein Chemistry.* **45**, 153-203. pmid: 8154369
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J. (2007). Concise Review: Mesenchymal Stem Cells: Their Phenotype, Differentiation Capacity, Immunological Features, and Potential for Homing. *Stem Cells: tissue-specific stem cells.* *Oswestry.* **25**, 2739-2749. doi: 10.1634/stemcells.2007-0197
- Corcoran, D., Fair, T., Park, S., Rizos, D., Patel, O. V., Smith, G. W., Coussens, P. M., Ireland, J. J., Boland, M. P., Evans, A. C. O., Lonergan, P. (2006). Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in *in vitro* compared with *in vivo* cultured bovine embryos. *Reproduction.* [s.l.], **131**, 651-660. doi: 10.1530/rep.1.01015
- Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E., Farin, C. E. (2004). Ultrastructural morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology Reproduction Science.* **84**, 169-177. pmid: 11319141
- Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E., Farin, C. E. (2000). Ultrastructural morphometry of bovine compact morulae produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction.* **62**, 1459-1465. <https://doi.org/10.1095/biolreprod62.5.1459>
- De Schauwer C, Goossens K, Piepers S, Hoogewijs MK, Govaere JL, Smits K, Meyer E, Van Soom A, Van de Walle GR. (2014). Characterization and profiling of immunomodulatory genes of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. *Stem Cell Res Ther.* **5**, 6. doi: 10.1186/scrt395
- Dean, W., Bowden, L., Aitchison, A., Klose, J., Moore, T., Meneses, J. J., Reik, W., Feil, R. (1998). Altered imprinted gene methylation and expression in completely ES cell derived mouse fetuses: Association with aberrant phenotypes. *Development.* **125**, 2273-2282. pmid: 9584126
- Dode, M. A. N., Dufort, I., Massicotte, L., Sirard, M. A. (2006). Quantitative expression of candidate genes for developmental competence in bovine two-cell embryos. *Molecular, Reproduction and Development.* **73**, 288-297. doi: 10.1002/mrd.20427
- Doherty, A. S., Mann, M. R. W., Tremblay, K. D., Bartolomei, M. S., Schultz, R.M. (2000). Differential effects of culture on imprinted H19 expression in the pre implantation mouse embryo. *Biol Reprod.* **62**, 1526-1535. pmid: 10819752
- Dominici, M.; Blanc, K. LE; Mueller, I.; et al. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytherapy.* **8**, 315-7. doi: 10.1080/14653240600855905

- Donofrio G, Franceschi V, Capocefalo A, Cavirani S, Sheldon IM. (2008). Bovine endometrial stromal cells display osteogenic properties. *Reproductive Biology and Endocrinology*. **6**:65. doi: 10.1186/1477-7827-6-65
- Everts, R. E., Chavatte-Palmer, P., Razzak, A., Hue, I., Green, C. A., Oliveira, R., Vignon, X., Rodriguez-Zas, S. L., Tian, X. C., Yang, X., Renard, J. P., Lewin, H. A. (2008). Aberrant gene expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. *Physiological Genomics*. **33**, 65-67. doi: 10.1152/physiolgenomics.00223.2007
- Fair, t., Carter, F., Parks, S., Evans, A. C. O., Lonergan, P. (2007). Global expression analysis during bovine oocyte *in vitro* maturation. *Theriogenology*. **68**, 91-97. doi: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.018
- Farin, P.W.; Crosier, A.E.; Farin, C.E. (2001). Influence of *in vitro* systems on embryo survival and fetal development in cattle. *Theriogenology*. **55**, 151– 170. pmid: 11198080
- Firts, N.L., Parrish, J.J. (1987). In-vitro fertilization of ruminants. *J. Reprod. Fertil.* **34**, 151-165. pmid: 3305915
- Flood, L. P., Shirley, B. (1991). Reduction of embryotoxicity by protein in embryo culture media. *Molecular Reproduction Development*. **30**, 226-231. doi: 10.1002/mrd.1080300310
- Fukui, Y. and Sakuma, Y. (1980). Maturation of bovine oocytes cultured *in vitro*; relation to ovarian activity, follicular size and the presence or absence of cumulus cells. *Biol. Reprod.* **22**, 669-673. pmid: 7388112
- Gad, A., Hoelker, M., Besenfelder, U., Havlicek, V., Cinar, U., Rings, F., Held, E., Dufort, I., Sirard M. A., Schellander, K., Tesfaye, D. (2012). Molecular Mechanisms and Pathways Involved in Bovine Embryonic Genome Activation and Their Regulation by Alternative *In vivo* and *In vitro* Culture Conditions. *Biology Of Reproduction*. **87**, 1-27. doi: 10.1095/biolreprod.112.099697
- Gargett C.E., Schwab, K.E., Zillwood, R.M., Nguyen, H.P., Wu, D. (2009). Isolation and culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium. *Biology of Reproduction*. **80**, 1136-1145. doi: 10.1095/biolreprod.108.075226
- Gilardi, S. G. T., Sá, W. F., Camargo, L. S. A., Ferreira, A. M., Machado, M. A., Serapião, R. V., Soares, A. B. M., Pinho, T. G., Viana, J. H. M. (2004). Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. **6**, 623-627. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352004000500009>
- Gomes, E.; Diez, C. (2000). Effects of glucose and protein sources on bovine embryo development *in vitro*. *Animal Reproduction Science*. **58**, 23-37. pmid: 10700642
- Gonçalves, P.B.D., Figueredo, J.R., Freitas, V.J.F. (2008). *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo: Roca. **2**, 395
- Gordon, I. (1994). *Laboratory production of cattle embryos*. Cambridge: Cambridge University Press. 227-292.
- Griffiths, A. J. F., Wessler, S. R., Lewontin, R. C., Gelbart, W. M., Suzuki, D. T., Miller, J. H. (2006). *Introdução a genética*. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1-23.

- Gutiérrez-Adán, A., Lonergan, P., Rizos, D., Ward, F.A., Boland, M.P., Pintado, B., De La Fuente, J. (2001). Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. *Theriogenology*. **55**, 1117-1126. pmid: 11322239
- Haidri, A. A.; Gwatkin, R. B. L. (1973). Requirements for the maturation of hamsters oocytes from preovulatory follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. **35**, 173-176. pmid: 4742159
- Han, M. S.; Niwa, K. (2003). Effects of BSA and fetal bovine serum in culture medium on development of rat embryos. *Journal of Reproduction and Development*. **49**, 235-242. pmid:14967933
- Hansel, W.(2003). The potential for improving the growth and development of cultured farm animal oocytes. *Animal Reproduction Science*. **79**, 191-201. pmid: 14643105
- Heyman, Y., Menezo, Y., Chesne, P., Camous, S., Gardinier, V. (1987). *In vitro* cleavage of bovine and ovine early embryos: Improved development using coculture with trophoblastic vesicles. *Theriogenology*. **27**, 59-68.
- Hirayama, K., et al., (1990). Rapid Confirmation and Revision of the Primary Structure of Bovine Serum-Albumin by Esims and Frit-Fab Lc Ms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 639-646. pmid: 2260975
- Huang, C. K.; Lee, S. O.; Lai, K. P. et al. (2013). Targeting androgen receptor in bone marrow mesenchymal stem cells leads to better transplantation therapy efficacy in liver cirrhosis. *Hepatology*. **57**, 1550–1563. doi: 10.1002/hep.26135
- Iglézias, José Carlos Rossini. (2004). Célula-tronco. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba, Sorocaba*. **6**, 3-9
- Janas, T., Janas, M.M., Sapon', K., Janas, T. (2015). Mechanisms of RNA loading into exosomes. *Febs Letters*. **589**, 1391-1398. doi: 10.1016/j.febslet.2015.04.036
- Kane, M. T. (1985). A low molecular weight extract of bovine serum albumin stimulates rabbit blastocyst cell division and expansion *in vitro*. *Journal of Reproduction and Fertility*. **73**, 147-150. pmid: 3968651
- Kang, Y. K., Koo, D. B., Park, J. S., Choi, Y.H., Chung, A. S., Lee, K. K., Han, Y. M. (2001). Aberrant methylation of donor genome in cloned bovine embryos. *Nat Genet*. **28**,173–177. doi: 10.1038/88903
- Khurana, N. K., Niemann, H. (2000). Energy metabolism in pre implantation bovine embryos derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod*. **62**, 847–856. pmid: 10727252
- Kim, E.Y., Lee, J.B., Park, H.Y., Jeong, C.J., Riu, K.Z., Park, S.P. (2011). The use of embryonic stem cell derived bioactive material as a new protein supplement for the *in vitro* culture of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*. **57**, 346-354. pmid: 21289468
- King, W. A., Niar, A., Betteridge, K. J. (1985). The nucleolus organizer regions of early bovine embryos. *J. Reprod. Fert.* **68** (Suppl.2):249(Abstr.).
- Knijn, H. M., Wrenzycki, C., Hendriksen, P. J., Vos, P. L., Herrmann, D., Van Der Weijden, G.C. (2002). Effects of oocyte maturation regimen on the relative abundance of transcripts in bovine blastocysts derived *in vitro* or *in vivo*. *Reproduction*. **124**, 365–75. pmid: 12201810
- Knijn, H.M., Gjørret, J.O., Vos, P. L. A. M., Hendriksen, P. J. M., Van Der Weijden, B.C., Maddox-Hyttel, P., Dieleman, S.J. (2003). Consequences of *in vivo* development and

subsequent culture on apoptosis, cell number, and blastocyst formation in bovine embryos. *Biology of Reproduction*. **69**, 1371-1378. doi: 10.1095/biolreprod.103.017251

Koerber, S., Santos, A. N., Tetens, F., Kuchenhoff, A., Fisher, B. (1998). Increased expression of NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 2 (ND2) in pre implantation rabbit embryos cultured with 20% oxygen concentration. *Mol Reprod Dev*. **49**, 394–399. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199804)49:4<394::AID-MRD6>3.0.CO;2-I

Krisher, R. L.; Bavister, B. D. (1999). Enhanced glycolysis after maturation of bovine oocytes *in vitro* is associated with increased developmental competence. *Molecular Reproduction and Development*. **53**, 19-26. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<19::AID-MRD3>3.0.CO;2-U

Kupker, W.; Diedrich, K.; Edwards, R. G. (1998). Principles of mammalian fertilization. *Human Reproduction*. **13**, 20-32. pmid: 9663767

Lainas T, Zorzovilis I, Petsas G, Alexopoulou E, Lainas G, Ioakimidis T. (2004). Osseous metaplasia: case report and review. *Fertil Steril*. **82**, 1433-5. doi: 10.1016/j.fertnstert.2004.04.055

Lange-Consiglio, A., Rossi, D., Tassan, S., et al. (2013). Conditioned Medium from Horse Amniotic Membrane-Derived Multipotent Progenitor Cells: Immunomodulatory Activity *In Vitro* and First Clinical Application in Tendon and Ligament Injuries *In Vivo*. *Stem Cells & Development*. **22**, 3015–3024. doi: 10.1089/scd.2013.0214

Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruij, T., Niemann, H., Galli, C. (2002). Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large offspring syndrome. *Biology of Reproduction*. **67**, 767–775. pmid: 12193383

Leese, H. J. (1988). The formation and function of oviduct fluid. *Journal of Reproduction and Fertility*. **82**, 843-856. pmid: 3283349

Li, H.Y., Chen, Y.J., Chen, S.J., Kao, C.L., Tseng, L.M., Lo, W.L., Chang, C.M., Yang, D.M., Ku, H.H., Twu, N.F. et al. (2010). Induction of insulin-producing cells derived from endometrial mesenchymal stem-like cells. *J Pharmacol Exp Ther*. **335**, 817–829. doi: 10.1124/jpet.110.169284

Lim, K. T., Jang, G., Ko, K. H., Lee, W. W., Park, H. J., Kim, J.J., Lee Hwang, W. S., Lee, B. C., Kang, S. K. (2007). Improved *in vitro* bovine embryo development and increased efficiency in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*. **67**, 293–302. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.07.011

Ling, B., Feng, D.Q., Zhou, Y., Gao, T., Wei, H.M and Tian, G.Z. (2008). 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. pmid: 19039379

Liu, L.; Trimarchi, J. R.; Navarro, P.; Blasco, M. A.; Keefe, D. L. (2003). Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability and apoptosis. *The Journal Biology Chemistry*. **26**, 31998-32004. doi: 10.1074/jbc.M303553200

Lonergan, P., Fair, T., Corcoran, D., Evan, A. C. (2006). Effect of culture on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. *Theriogenology*. **65**, 137-152. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.028

Lonergan, P., Khatir, H., Piumi, F., Rieger, D., Humblot, P., Boland, M. P. (1999). Effect of time interval from insemination to first cleavage on the developmental characteristics, sex ratio

and pregnancy rate after transfer of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility*. **117**, 159–167. pmid: 10645257

Lonergan, P.; Rizos, D.; Gutiérrez-Adán, A.; Moreira, P.M.; Pintado, B.; De La Fuente, J.; Boland, M.P. (2003). Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage *in Vitro* or *in Vivo*. *Biology of Reproduction*. **69**, 1424-31. doi: 10.1095/biolreprod.103.018168

Lötvall, Jan et al. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *Journal Of Extracellular Vesicles*. **3**, 26913-26919. doi: [10.3402/jev.v3.26913]

Mehta, T. S., Kiessling, A. A. (1990). Development potential of mouse embryos conceived *in vitro* and cultured in ethylenediaminetetraacetic acid with or without amino acids or serum. *Biology Reproduction*. **43**, 600-606. pmid: 2126963

Mello, R.R.C., Ferreira, J.E., Sousa, S. L. G., Mello, M. R. B., Palhano, H. B. (2016). Produção *in vitro* (PIV) de embriões em bovinos. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. **40**, 58-64.

Memili, E., First, N. L. (2000). Zygotic and embryonic gene expression in cow: a review of timing and mechanisms of early gene expression as compared with other species. *Zygote*. **8**, 87–96. pmid: 10840878

Memili, E., First, N.L. (1999). Control of gene expression at the onset of bovine embryonic development. *Biology of Reproduction*. **61**, 1198–1207. pmid: 10529265

Mermillod P, Oussaid B, Cognié Y. (1999). Aspects of follicular and oocyte maturation that affect the developmental potential of embryos. *J Repro Fert Suppl*. **54**, 449-60. pmid: 10692875

Mingoti, G. Z. (2000). Maturação oocitária associada à esteroidogênese: papel do soro sanguíneo, albumina sérica e hormônios esteróides. 2000. 141 f. Tese (Doutorado em Fisiologia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Miranda, M.S., Nascimento, H.S., Costa, M.P.R., Costa, N.N., Brito, K.N.L., Lopes, C.T.A., Santos, S.S.D., Cordeiro, M.S., Ohashi, O.M. (2016). Increasing of blastocyst rate and gene expression in co-culture of bovine embryos with adult adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. **33**, 1395-1403. . doi: 10.1007/s10815-016-0779-0

Misirlioglu, M., Page, G.P., Sagirkaya, H., Kaya, A., Parrish, J.J., First, N.L., and Memili, E. (2006). Dynamics of global transcriptome in bovine matured oocytes and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 18905-10. doi:10.1073/pnas.0608247103

Moore, T. (2001). Genetic conflict, genomic imprinting and establishment of the epigenotype in relation to growth. *Reproduction*. **122**, 185–193. pmid: 11467969

Moraes, C. N. de., Maia, L., Dias, M. C., Dell’Áqua, C. P. F., Mota, L. S. M. S. da., Chapwanya, A., Landim-Alvarenga, F. C., Oba, E. (2016). Bovine endometrial cells: a source of mesenchymal stem/progenitor cells. *Cell Biology International*. **40**, 1332-1339. doi: 10.1002/cbin.10688

Moraes, C.N. de., Maia, L., Oliveira, E. de., Dell’Áqua, C.P.F., Chapwanya, A., Landim-Alvarenga, F. C., Oba, E. (2017). Shotgun proteomic analysis of the secretome of bovine endometrial mesenchymal progenitor/stem cells challenged or not with bacterial lipopolysaccharide. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. **187**, 42-47. doi: 10.1016/j.vetimm.2017.03.007

- Morita, Y., Tsutsumi, O., Oka, Y., Taketani, Y. (1994). Glucose transporter Glut1 mRNA expression in the ontogeny of glucose incorporation in mouse pre implantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* **199**, 1525–1531. doi: 10.1006/bbrc.1994.1404
- Nauta AJ, Fibbe WE. (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood.* **110**, 3499-506. doi: 10.1182/blood-2007-02-069716
- Niemann, H., Wrenzycki, C. (2000). Alterations of expression of developmentally important genes in pre implantation bovine embryos by *in vitro* culture conditions: Implications for subsequent development. *Theriogenology.* **53**, 21–34. pmid: 10735059
- Oyamada, T.; Iwayama, H.; Fukui, Y. (2004). Additional effect of epidermal growth factor during *in vitro* maturation for individual bovine oocytes using a chemically defined medium. *Zygote.* **12**, 143–150. pmid: 15460109
- Palma, G.A. (2001). *Biotecnologia de la Reproducion.* Ediciones Instituto Nacional de Tecnologia Agropecuaria (INTA). **1**, 149-97.
- Park, H., Kim, E., Lee, S., Choi, H., Moon, J.J., Park, M., Son, Y., Lee, J., Jeong, C., Lee, D., Riu, K. and Park S. (2013). Effect of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal-Stem-Cell Bioactive Materials on Porcine Embryo Development. *Molecular Reproduction & Development.* **80**, 1035–1047. doi: 10.1002/mrd.22270
- Pinyopummintr, T.; Bavister, B. D. (1994). Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: effects of type of serum, of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology.* **41**, 1241-1249. pmid: 16727477
- Raposo, G. e Stoorvogel, W. (2013). Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* **200**, 373–383. doi: 10.1083/jcb.201211138
- Razza, E. M. (2017). Expressão gênica diferencial, análise ultraestrutural e avaliação do perfil lipídico de blastocistos bovinos produzidos *in vitro* a partir de oócitos maturados convencionalmente ou pelo sistema spom. Tese (Doutorado). Arquivos do Instituto de Biociências de Botucatu - UNESP. 14-123.
- Rehman, N. U., Sarwar, M., Samad, H. A. (2001). *In vitro* Production of Bovine Embryos - A Review. *Asian Australasian Association of Animal Production Societies.* **14**, 1342-135.
- Renesto, A., Coelho, L. A. (2004). Associação das biotécnicas: Aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e superovulação na produção *in vitro* e *in vivo* de embriões bovinos. Tese (Mestrado). Arquivos da Faculdade de Ciências Agrárias UNESP. 17-31.
- Rizos, D., Gutiérrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P., Lonergan, P. (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction.* **68**, 236–43. pmid: 12493719
- Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M.P., Arroyo-Garcia, R., Pintado, B., de la Fuente, J., Gutierrez-Adan, A. (2002). Analysis of differential mRNA expression. between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biology of Reproduction.* **66**, 589–595. pmid: 11870062
- Rubin, M. (2005). Histórico dos 20 anos da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (1985-2005). *Acta Sci Vet.* **33**, 35-54.
- Salilew-Wondim, D., Schellander, K., Hoelker, M., and Tesfaye, D. (2012). Oviductal, endometrial and embryonic gene expression patterns as molecular clues for pregnancy establishment. *Anim Reprod Sci.* **134**, 9-18. doi: 10.1016/j.anireprosci.2012.08.006

- Santamaria, X., Massasa, E.E., Feng, Y., Wolff, E., Taylor, H.S. (2011). Derivation of insulin producing cells from human endometrial stromal stem cells and use in the treatment of murine diabetes. *Mol Ther.* **19**, 2065–2071. doi: [10.1038/mt.2011.173]
- Sartori, R., A.B. Prata, A.C.S. Figueiredo, B.V. Sanches, G.C.S. Pontes, J.H.M. Viana, J.H. Pontes, J.L.M. Vasconcelos, M.H.C. Pereira, M.A.N. Dode, P.L.J. Monteiro Jr, P.S. Baruselli. (2016). Update and overview on assisted reproductive technologies (ARTs) in Brazil. *Anim. Reprod.* **13**, 300-312. doi: 10.21451/1984-3143-AR873
- Sato, E.; Iritani, A.; Nishikawa, Y. (1977). Factors involving *in vitro* maturation of pig and cattle follicular oocytes cultured *in vitro*. *Japanese Journal of Animal Reproduction.* **23**, 12-18.
- Schmidt M, Greve T, Avery B, Beckers JF, Sulon J, Hansen HB. (1996). Pregnancies, calves and calf viability after transfer of *in vitro* produced bovine embryos. *Theriogenology.* **46**, 527-539. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(96\)00174-4](https://doi.org/10.1016/0093-691X(96)00174-4)
- Schultz, R. M. (1993). Regulation of zygotic gene activation in the mouse. *Bioessays.* **15**, 531-538. doi: 10.1002/bies.950150806
- Senger, P. L. (2003). Pathways to Pregnancy and Parturition. *Current Conceptions.* **2**, 284-96.
- Serapião, R. V. (2007). Desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro* cultivados em meio livre de soro. 2007. 82 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina Veterinária, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro
- Sinclair KD, Maxfield EK, Robinson JJ, Maltin CA, McEvoy TG, Dunne LD, Young LE, Broadbent P. J. (1997). Culture of sheep zygotes can alter fetal growth and development. *Theriogenology.* **47**, 380.
- Sirard MA, Richard F, Blondin P, Robert C. (2006). Contribution of the oocyte to embryo quality. *Theriogenology.* **65**, 126-36. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.09.020
- Skalnikova, H. K. (2013). Proteomic techniques for characterisation of mesenchymal stem cell secretome. *Biochimie.* **95**, 2196–2211. doi: 10.1016/j.biochi.2013.07.015
- Stenger EO, Krishnamurti L, Galipeau J. (2015). Mesenchymal stromal cells to modulate immune reconstitution early post-hematopoietic cell transplantation. *BMC Immunology.* **16**, 1-10. doi: 10.1186/s12865-015-0135-7
- Takahashi, K.; Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* **126**, 663–676. doi: 10.1016/j.cell.2006.07.024
- Tesfaye D, S Ponsuksili, K Wimmers, M Gilles and K Schellander. (2004). A comparative expression analysis of gene transcripts in post-fertilization developmental stages of bovine embryos produced *in vitro* or *in vivo*. *Reprod Dom Anim.* **39**, 396-404. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2004.00531.x>
- Thibault, C. (1966). La culture *in vitro* de l'oeuf de vache. *Ann. Biol. Animam. Biochem. Biophys.* **6**, 159-164.
- Thompson, J. G. (1997). Comparison between *in vivo*-derived and *in vitro* produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. *Reprod Fertil Dev.* **9**, 341–354. pmid: 9261882
- Thompson, J. G. (2000). *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos – a decade of achievement. *Animal Reproduction Science.* **60-61**, 263-275. pmid: 10844200

- Valadi, H., Ekstrom¹, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J. and Lotvall, J.O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 654–659. doi: 10.1038/ncb1596
- Van Arendonk, J. A. M.; Bijma, P. (2003). Factors affecting commercial application of embryo technologies in dairy cattle in Europe—a modeling approach. *Theriogenology*. **59**, 635–649. pmid: 12499009
- Van Wagtenonk-de Leeuw, A.M., Aerts, .B.J.G., Den Daas, J.H.G. (1998). Abnormal offspring following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology*. **49**, 883–894. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(98\)00038-7](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(98)00038-7)
- Van Wagtenonk-de Leeuw, A.M.; Mullaart, E.; De Roos, A. P. W.; Merton, J.S.; Den Daas, J.H.G.; Kemp, B.; De Ruigh, L. (2000). Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology*. **53**, 575–97. pmid: 10735051
- Viana, J. H. M.; Siqueira, L. G. B.; Palhão, M. P., Camargo, L. S. A. (2012). Features and perspectives of the Brazilian *in vitro* embryo industry. *Animal Reproduction*. **9**, 12–18.
- Viana, J.H.M. (2012). Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futuras. *O Embrião*, ano XVI. **51**, 6–10.
- Walter I, Helmreich M, Handler J, Aurich C. (2003). Mineralised deposits in the uterine glands of mares with chronic endometrial degeneration. *Vet Rec.* **153**, 708–710. pmid: 14690074
- Watson, A.J. (1992). The cell biology of blastocyst development. *Molecular Reproduction and Development*. **33**, 492–504. doi: 10.1002/mrd.1080330417
- Watson, A.J., Barcroft, L.C. (2001). Regulation of blastocyst formation. *Front Bioscience*. **6**, 708–730. pmid: 11333210
- Wobus A.M., Boheler K.R. (2005). Embryonic Stem Cells: Prospects for Developmental Biology and Cell Therapy. *Physiol Rev.* **85**, 635–678. doi: 10.1152/physrev.00054.2003
- Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Lemme E, Korsawe K, Niemann H. (2004). Gene expression patterns in *in vitro*-produced and somatic nuclear transfer-derived preimplantation bovine embryos: relationship to the large offspring syndrome?. *Anim Reprod Sci.* **82-83**, 593–603. doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.05.009
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carwath, J. W., Niemann, H. (1998). Expression of RNA from developmentally important genes in pre implantation bovine embryos produced in TCM supplemented with BSA. *J Reprod Fertil.* **112**, 387–398. pmid: 9640278
- Wrenzycki, C., Herrmann, D., Carwath, J. W., Niemann, H. (1999). Alterations in the relative abundance of gene transcripts in pre implantation bovine embryos cultured in medium supplemented with either serum or PVA. *Mol Reprod Dev.* **53**, 8–18. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199905)53:1<8::AID-MRD2>3.0.CO;2-K
- Wrenzycki, C., Wells, D., Herrmann, D., Miller, A., Oliver, J., Tervit, R., Niemann, H. (2001). Nuclear transfer protocol affects messenger RNA expression patterns in cloned bovine blastocysts. *Biol Reprod.* **65**, 309–317. pmid: 11420254
- Wright, W. R. Jr., Anderson, G. B., Cupps, P. T., Drost, M. (1976a). Blastocyst expansion and hatching of bovine ova cultured *in vitro*. *J. Animal Science.* **43**, 170–174. pmid: 939723
- Wright, W. R. Jr., Anderson, G. B., Cupps, P. T., Drost, M. (1976b). Successful cultured *in vitro* of bovine embryos to the blastocyst stage. *Biology Reproduction.* **14**, 157–162.

Wu, X., Viveiros, M. M., Eppig, J. J., Bai, Y. (2003). Zygote arrest 1 (*Zar1*) is a novel maternal-effect gene critical for the oocyte-to-embryo transition. *Nature Genetics*. **33**, 187-191. doi: 10.1038/ng1079

Young, L. E., Fernandes, K., McEvoy, T. G., Butterwith, S. C., Gutierrez, C. G., Carolan, C., Broadbent, P. J., Robinson, J. J., Wilmut, I., Sinclair, K. D. (2001). Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture. *Nat Genet*. **27**, 153–154. doi: 10.1038/84769

Zago, M. A. (2006). Célula-tronco: origens e propriedades. In: ZAGO, M. A.; COVAS, D. T. Células-tronco: a nova fronteira da medicina. São Paulo; Atheneu.

Zhang, P., Kerkela, E., Skottman, H., Levkov, L., Kivinen, K., Lahesmaa, R., Hovatta, O., Kere, J. (2007). Distinct sets of developmentally regulated genes that are expressed by human oocyte and human embryonic stem cells. *Fertility and Sterility*. **87**, 677-690. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.07.1509>

Capítulo 2

1 **Effect of Bovine Endometrial Mesenchymal Cell Conditioned Medium on Bovine**
2 **Embryo Development**

3 **Running title: Conditioned Medium on Bovine Embryo Development**

4 Laís N. Cintra^{a*}, Elena Carolina S. Recalde^a, Mateus J. Sudano^b, Fernanda F. Franchi^c,
5 Anthony C.S. Castilho^{cd} and Fernanda C. Landim-Alvarenga^a

6 ^aDepartment of Animal Reproduction and Veterinary Radiology, School of Veterinary Medicine
7 and Animal Science (FMVZ), São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil

8 ^bCenter of Natural and Human Sciences (CCNH), Federal University of ABC (UFABC)

9 ^cDepartment of Pharmacology, Institute of Bioscience (IBB), São Paulo State University
10 (UNESP), Botucatu, Brazil

11 ^dDepartment of Animal Science, University of Western São Paulo (UNOESTE), Presidente
12 Prudente, Brazil

13 *Corresponding author: email: laisncintra@gmail.com

14

15 This manuscript will be submitted to the Reproduction, Fertility and Development.

16 **Abstract**

17 Endometrial mesenchymal stromal cell (eMSCs) secretes bioactive molecules such as
18 cytokines and growth factors which are released as soluble factors or through
19 extracellular vesicles (EVs). Conditioned medium (CM) of the MSCs maintains the
20 immunomodulation and regenerative potential properties of the cells that produced it.
21 This study investigated the use of CM by eMSC plus BSA as alternative to FBS in
22 embryo culture medium. The developmental ability and quality of bovine embryos were
23 determined by assessing their cell number and gene expression. The percentage of
24 embryos that underwent cleavage was similar ($P>0.05$) among the groups but blastocyst
25 formation was higher ($P<0.05$) in FBS group. The total cell number was higher in CM
26 group, but not statistically different from the others ($P>0.05$). The relative mRNA
27 expression of *ELOVL6* was higher in the CM group, *CASP3* in the BSA group, *ACSL3*
28 and *VEGF* in the FBS group. Taken together, these data suggest that CM can be used as
29 an alternative supplement to FBS. We observed a different gene expression profile,
30 suggesting the CM inhibited an increase in the relative mRNA levels for *CASP3*.
31 Moreover, the CM favored the total number cells, inhibited the percentage of cells in
32 apoptosis and produces better quality embryo.

33

34 **Additional keywords:** RT-qPCR, supplementation, endometrial mesenchymal stromal
35 cell, conditioned medium, total cell number, embryo culture.

36 **Introduction**

37 Mesenchymal stem cells (MSCs) are multipotent cells which have attracted great
38 interest in the fields of human and animal medicine because of their unique
39 immunomodulatory properties (Moraes et al. 2016).

40 MSCs secrete bioactive molecules such as cytokines and growth factors which
41 are released as soluble factors or through extracellular vesicles (EVs) (Ashiba et al.,
42 2015). These soluble factors, such as PGE₂, INF- γ , IDO, IL-4, IL10, TGF- β and HGF,
43 among others, can be found in the media where MSCs were cultured (De Schauwer et
44 al., 2014). Only a few studies describe in detail the presence of these cells in bovines,
45 and even fewer give an in-depth characterization of these cells, which would be of great
46 interest in clinical treatments (Moraes *et al.* 2016).

47 Many studies have shown that the conditioned medium (CM) of the MSCs
48 maintains the immunomodulation and regenerative potential properties of the cells that
49 produced it, thus becoming a major attraction for human and veterinary regenerative
50 medicine because it opens the possibility of acellular therapeutic protocols. Ling *et al.*
51 (2008) were the first to use SC during the IVPE. These authors used CM derived from
52 bone marrow mesenchymal stem cells from mice in *in vitro* maturation (IVM), reporting
53 a significant increase in oocyte maturation rate.

54 Another alternative is the use of MSC for co-culture of embryos. Miranda *et al.*
55 (2016) observed an increase in the production of blastocysts co-cultured with MSC-
56 bovine adipose tissue (bAT). Blastocysts co-cultured with 10⁴ MSC-bTA also showed
57 an increase in total number of cells, a relative increase in expression of pluripotency
58 (*POU5F1*) and glucose metabolism (*G6PDH*) genes, but did not affect the expression of
59 the stress marker (*HSP70*).

60 During *in vitro* production of embryos (IVPE), not only the maturation step is
61 altered dramatically (immature oocytes are collected from ovary in different stages of
62 atresia or growth), but also fertilization and culture are performed in a way far removed

63 from the natural processes. The fact that these steps take place outside the female tract
64 will have an effect on both the quantity and the quality of embryos and offspring
65 produced (van Wagendonk-de Leeuw *et al.* 2000).

66 Almost all media used for bovine embryo development *in vitro* contain bovine
67 serum albumin (BSA) and fetal bovine serum (FBS). BSA and FBS are complex and
68 indefinite mixtures of vitamins, proteins, growth factors and peptides (Lim *et al.* 2007).
69 The factors found in FBS are beneficial for the morula compaction and blastocyst
70 development (Thompson, 2000; Crosier *et al.*, 2004). However, their use is correlated
71 with the occurrence of various abnormalities including exacerbated fetal growth,
72 increased fetal and placental weight, abnormal development of fetal musculoskeletal
73 system and placental blood vessels (Lazzari *et al.* 2002; Everts *et al.* 2008).
74 Additionally, the presence of serum over a prolonged period of time has been shown to
75 alter the expression patten of various genes (Abe *et al.* 2002; Rizos *et al.* 2003).

76 Stem cells (SC) are important for living organisms for several reasons. In the
77 human embryo, in the phase of the day 3 to day 5 - called blastocyst -, a small group of
78 approximately 30 cells, known as inner cell mass (ICM), gives rise to a hundreds highly
79 specialized cells, necessary for the appearance of a adult organism. During fetal
80 development, SC from developing tissues give rise to multiple types of specialized cells
81 that raise the heart, lungs, skin, and other tissues (Iglézias 2004).

82 The development of blastocyst is only the first step along the entire process for
83 the production of a healthy calf, therefore increasing success rates in IVPE (number of
84 oocytes that develop to the blastocyst stage) is essential for the embryos to be of better
85 quality and to ensure optimal pregnancy rates (Lonergan *et al.* 2003). There is abundant
86 evidence that the embryonic culture system has a dramatic effect on expression pattern
87 of mRNA of several genes important for embryonic and fetal development.

88 Our study proposed the unprecedented use of CM produced by eMSC during *in*
89 *vitro* embryo culture (IVC), using bovine model (species-specific interaction).

90 **Materials and methods**

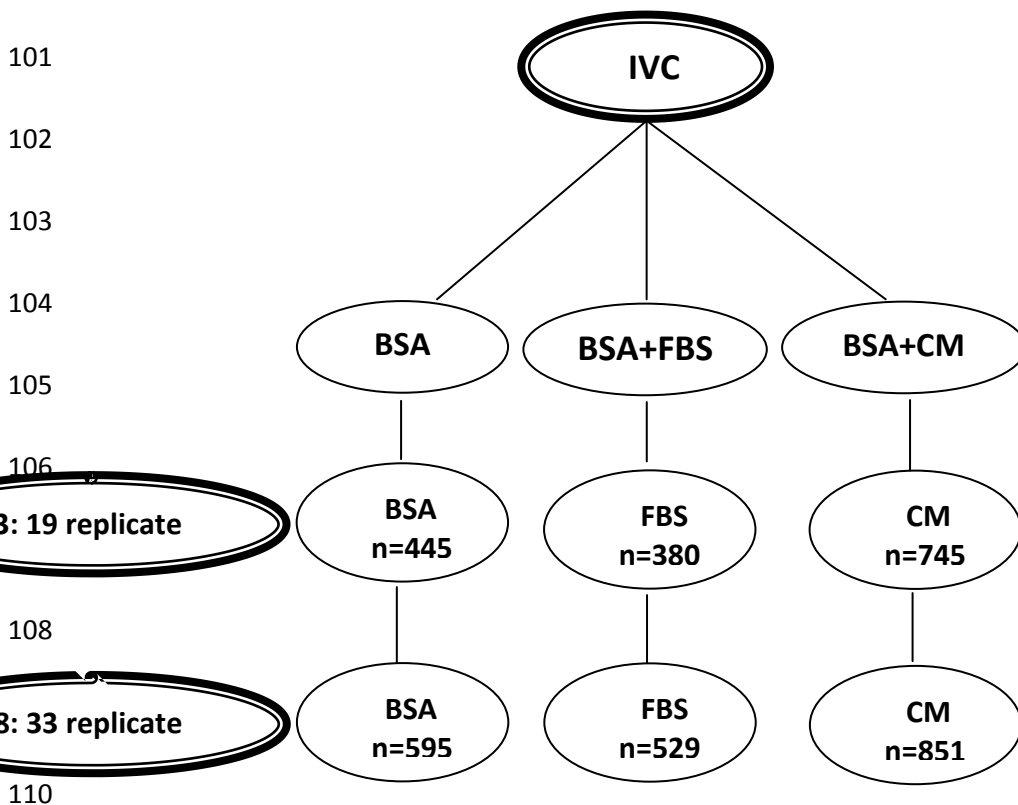
91 Ethics statement

92 All of the methods and experimental procedures were conducted according to the
93 approved (Aprovall ID: Protocoll CEUA 0193/2017) guidelines and regulations by the
94 National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), Department of
95 Animal Reproduction and Veterinary Radiology at São Paulo State University
96 (UNESP), School of Veterinary Medicine and Animal Science.

97 Chemicals

98 Unless otherwise noted, all chemicals and reagents were obtained from Sigma-Aldrich
99 (St. Louis, MO, USA).

100 Experimental design



111 In the present study, we supplemented a type of IVC medium, synthetic oviduct fluid
112 with amino acids, sodium citrate and myo-inositol (SOFaaci), with bovine serum
113 albumin (BSA) plus conditioned media (CM) produced by endometrial mesenchymal
114 stem cells (eMSCs) to test their beneficial effects on bovine embryo development *in*
115 *vitro*. For this purpose, SOFaaci medium supplemented with BSA + CM
116 (SOFaaci+BSA+CM group) was compared with SOFaaci medium with BSA alone
117 (SOFaaci+BSA group) and SOFaaci medium with BSA + fetal bovine serum (FBS)
118 (SOFaaci+BSA+FBS group).

119 Preparation of conditioned medium

120 All laboratory procedures were performed at the Animal Advanced Assisted
121 Reproduction and Cell Therapy Laboratory (LANÇA) of the School of Veterinary
122 Medicine and Animal Sciences (Unesp-Botucatu, SP). Endometrial mesenchymal stem
123 cells (eMSCs) (1×10^6 density) samples in the third pass, previously characterized
124 (Moraes et al., 2016) were thawed at 37 °C for 5 minutes, washed once in the culture
125 medium and centrifuged at 940 g for 10 min. The sediment was plated in 75 cm² plastic
126 bottles and cultured at 37.5 °C in humid atmosphere containing 95% air and 5% CO₂
127 during 5 days (70% confluence). The culture medium consisting of DMEM low
128 glucose/F12 (1:1, Gibco, USA), supplemented with 20% FBS (FBS, Gibco, USA), 1%
129 penicillin/streptomycin (Gibco, USA), 1.2% amphotericin B (Gibco, USA) and 0,04%
130 ampicillin (Teuto®, BRA). To obtain the CM, the culture medium was discarded and
131 bottle washed five times with PBS and the culture medium replaced with medium
132 without FBS for 96 hours. The CM obtained after 96 hours of MSC culture in FBS
133 privation, was centrifuged, filtered through 0.22 µm cell strainer and stored at -80 °C.

134 Oocyte collection

135 Ovaries obtained at a local abattoir and transported to the laboratory in sterile saline
136 solution (0.9% NaCl) at 28-30°C. All the subsequence procedures, unless otherwise,
137 were performed between 35-37°C. Ovaries were washed in 0.9% NaCl and cumulus-
138 oocyte complexes (COCs) were recovered from follicles with a diameter of 2-6 mm
139 using an 40 x 12 mm gauge needle and pooled in a 15 mL conical tube. After
140 sedimentation, COCs were recovered and selected using a stereomicroscope. Grade 1
141 and Grade 2 COCs with more than three layers of compact cumulus cells and
142 homogenous cytoplasm were selected for *in vitro* maturation. The COCs were washed
143 three times in TCM 199 with Earle's salts and 25mM HEPES (Gibco Invitrogen Co.,
144 Grand Island, NY, USA), supplemented with 10% FBS (Gibco, USA), 100 IU/mL
145 penicillin (Gibco, USA), 100 mg/mL streptomycin (Gibco, USA), 16.7 µg/µl ampicillin
146 (Teuto®, BRA), 100 mM pyruvate and 1 µg/µl FSH (Folltropin; Bioniche).

147 *In vitro* maturation

148 Selected oocytes were washed three times in TCM 199 with Earle's salts (Gibco
149 Invitrogen Co., Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% FBS, sodium

150 pyruvate, streptomycin sulfate, penicillin and ampicillin. Groups of 20-25 COCs were
151 placed in Petri dishes with droplets contained 90 μ l IVM medium, covered with mineral
152 oil and incubated under a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 38.5°C for 24h.

153 *In vitro* fertilisation

154 Following maturation period, oocytes were transferred to drops (20–25 oocytes per
155 drop) containing 90 μ l of IVF-Fert (Parrish et al. 1988) supplemented with BSA (6
156 mg/mL), pyruvate (100 mM), penicillamine (2 mM), hypotaurine (1 mM), epinephrine
157 (245 μ M), streptomycin sulfate (100 mgmL⁻¹), penicillin (100 IU/mL), ampicillin (16.7
158 μ g/ μ l) and heparin (10 μ gmL⁻¹) and covered with mineral oil. Frozen semen from a
159 single Nelore bull that had been test previously for IVF was used. Spermatozoa were
160 selected using the Percoll method (Parrish et al. 1995) and the concentration was
161 adjusted to 2 x 10⁶ sperm cells mL⁻¹. Spermatozoa and oocytes were incubated for 18 h
162 at 38.5°C with 5% CO₂ in air. The day of *in vitro* insemination was considered as Day
163 0.

164 *In vitro* culture

165 Eighteen hours post insemination (h.p.i.), presumptive zygotes were denuded by
166 repeated pipetting, washed, transferred to culture plates and placed into drops
167 containing 150 μ L of culture medium (20–25 presumptive zygotes per drop), covered
168 with mineral oil and cultured in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 20% O₂ with
169 the balance N₂. The culture medium containing SOFaaci (Holm et al. 1999)
170 supplemented with (1) 5 mg/mL BSA (SOFaaci+BSA group), (2) 5 mg/mL BSA + 20%
171 CM (SOFaaci+BSA+CM group) or (3) 5 mg/mL BSA + 2.5 % fetal bovine serum
172 (FBS) (SOFaaci+BSA+FBS group). To avoid excessive manipulation, no feeding was
173 done, random routines (19 rounds of IVF) for D3 were selected. The embryos remained
174 in this condition until Day 8 (33 rounds of IVF) when blastocyst production was
175 evaluated. In the end of Day 8, expanded blastocysts (15 per group) were washed three
176 times in TCM 199 HEPES and subjected to the staining protocol with some
177 modifications (Fouladi-Nashta et al., 2005). For the mRNA extraction and gene
178 expression analysis, Day 8 expanded blastocyst were washed three times in RNase
179 OUT (Thermo Fisher Scientific), transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube (3 blastocysts
180 per tube) and stored at -80°C until mRNA extraction.

181 Apoptosis detection, Counting of TE and inner cell mass (ICM) cells

182 Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated X-dUTP nick end labeling (TUNEL)
183 was performed according to the manufacturer's protocol using an *In Situ* Cell Detection
184 Kit (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) (15 expanded blastocyst per group).
185 The staining with Hoechst-33342 was used to verify the total number of cells of the
186 embryos. The staining with propidium iodide (PI) was used to verify the cells of
187 trophoctoderm (TE). ICM determination was done by subtracting the total number of
188 cells and TE cells.

189 For that, Fouladi-Nashta et al., 2005 staining protocol was used with some
190 modifications. Embryos were washed in a washing solution (LAV), PBS containing 2
191 mg/ml BSA and permeabilized in 0.2% Triton X-100 in LAV for 25 seconds at room
192 temperature, and immediately washed twice in LAV solution. Embryos were transferred
193 in LAV solution containing 30 µg/ml propidium iodide (PI) and incubated in the dark
194 for 5 min in a 37°C, and washed twice in LAV solution. Embryos were incubated in 4%
195 paraformaldehyde containing 10 µg/ml bisbenzimidazole (Hoechst 33342; Hoechst, Sigma)
196 for 30 min at room temperature, followed by twice washing LAV solution. Embryos
197 were incubated in a freshly prepared solution of 0.1% Triton X-100 in 0.1% sodium
198 citrate (v/v) for 5 min and then washed twice in LAV solution. Embryos were incubated
199 in the reagent (1:10 dilution of the enzyme solution (terminal deoxynucleotidyl
200 transferase dUTP) in label solution (nucleotide mixture) in the dark, in a humid
201 chamber for 1 h at 37°C. After washing with LAV, expanded blastocysts were mounted
202 onto glass slides with 10 µl glycerol and examined under either an epifluorescence
203 microscope (Olympus IX71). TUNEL-positive cells were bright green indicating the
204 occurrence of apoptosis.

205 RNA extraction and reverse transcription

206 Total RNA was extracted from 5 pools per group (3 expanded blastocysts/pool) using
207 PicoPure® RNA isolation kit (Applied Biosystems) according manufacturer's protocol
208 and eluted in 12 µl of elution buffer. Total RNA was incubated with DNase I (1 U/µg;
209 Invitrogen, São Paulo, Brazil) and then reverse transcribed using random primer and
210 according with the protocol provided by the High Capacity kit (Applied Biosystems,
211 São Paulo, Brazil). The cDNA samples were kept at -20°C until used for quantitative
212 polymerase chain reaction (qPCR).

213 Quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR) analysis

214 Expression of the target genes was investigated by real-time PCR assay using the Power
 215 Sybr Green PCR Master Mix[®] system (Applied Biosystems[®]) in StepOnePlus[®] (Applied
 216 Biosystem[®]) equipment. To improve the reproducibility of the results, samples from the
 217 same cDNA source were run in duplicate for each PCR reaction. The relative expression
 218 values for each gene were calculated with the $\Delta\Delta$ CT method with efficiency correction
 219 and using one control sample as calibrator (Pfaffl, 2001). Reference gene used for
 220 normalisation, peptidylprolyl isomerase A (*PPIA*). RT-qPCR was performed to quantify
 221 the mRNA expression levels of several target genes (Table 1), acyl-CoA synthetase
 222 long-chain family member 3 (*ACSL3*), acyl-CoA synthetase long-chain family member
 223 6 (*ACSL6*), ELOVL fatty acid elongase 6 (*ELOVL6*), carnitine palmitoyltransferase 1B
 224 (*CPT1B*), caudal type homeobox-2 (*CDX2*), POU class 5 homeobox 1, OCT4
 225 (*POU5F1*), vascular endothelial growth factor (*VEGF*), insulin-like growth factor
 226 receptor 1 (*IGFR1*), epidermal growth factor receptor (*EGFR*), interferon tau (*IFNT2*),
 227 placenta-specific 8 (*PLAC8*), superoxide dismutase 2, mitochondrial (*SOD2*), heat
 228 shock protein 70 (*HSP70*), BCL2 associated X apoptosis regulator (*BAX*), caspase 3,
 229 apoptosis-related cysteine peptidase (*CASP3*).

230 **Table 1. Primer sequences used to analyse expression of target and housekeeping**
 231 **genes in Day-8 expanded blastocysts**

232 Abbreviations: F, forward; R, reverse; Tm, melting temperature

233

Gene	Sequence	Tm (°C)
<i>ACSL3</i>	F: 5'-ATAACTGGGATGGCGGAAAG-3'	60
	R: 5'-GACAGACAAGCTCAGCACTTA-3'	
<i>ACSL6</i>	F: 5'-CCTGTTGCCCAAGTCTATGT-3'	60
	R: 5'-CGTCCCTTCCAATTCCTCTCTTC-3'	
<i>BAX</i>	F: 5'-TGTTTTCTGACGGCAACTTCA-3'	60
	R: 5'-CGAAGGAAGTCCAATGTCCAG-3'	
<i>CASP3</i>	F: 5'-AACAGTCAGTCAGTCAGTTGGGCA-3'	60
	R: 5'-ACACACACCCGTAGCTGTGAAGAA-3'	
<i>CDX2</i>	F: 5'-TGGAGCTGGAGAAGGAGTTTCACT-3'	56
	R: 5'-TCCTTCGCTCTGCGTTCTGAAAT-3'	
<i>CPT1B</i>	F: 5'-CTGCTGAGAAGCACCAGAATA-3'	60
	R: 5'-GGTACTTGGAGACCACGTAAAG-3'	
<i>EGFR</i>	F: 5'-AAAGTTTGCCAAGGGACAAG-3'	53
	R: 5'-AAAGCACATTTCTCGGATG-3'	
<i>ELOVL6</i>	F: 5'-CTGTACTCCTGGTACTCCTACA-3'	60
	R: 5'-GCTCGCAAGGCATAGTAAGA-3'	
<i>HSP70</i>	F: 5'-AACAAAGATCACCATCACCAAAC-3'	60
	R: 5'-TCCTTCTCCGCCAAGGTGTTG-3'	
<i>IFNT2</i>	F: 5'-GATCCTTCTGGAGCTGGYTG-3'	60

	R: 5'-GCCC GAATGAACAGACTCYC-3'	
<i>IGFRI</i>	F: 5'-TTAAAATGGCCAGAACCTGAG-3'	60
	R: 5'-TTATAACCAAGCCTCCCAC-3'	
<i>OCT4</i>	F: 5'-TGGAGGAAGCTGACAACA-3'	60
	R: 5'-ATGTGGCTAATTTGCTGCA-3'	
<i>PLAC8</i>	F: 5'-GACTGGCAGACTGGCATCTT-3'	60
	R: 5'-CTCATGGCGACACTTGATCC-3'	
<i>PPIA</i>	F: 5'-GCCATGGAGCGCTTTGG-3'	60
	R: 5'-CCACAGTCAGCAATGGTGATCT-3'	
<i>SOD2</i>	F: 5'-AGCACGAGCAGGAGACTGGT-3'	60
	R: 5'-GACGTTGAGGTTGTTACGTTAG-3'	
<i>VEGF</i>	F: 5'-CCCAGATGAGATTGAGTTTCATTTT-3'	60
	R: 5'-ACCGCCTCGGCTTGTCAC-3'	

234

235 Statistical analysis

236 Data of cleavage percentage and blastocyst were transformed by arcsine. The mRNA
 237 abundance data were transformed by logarithms in order to reach normal distribution, if
 238 was necessary. All data were tested by analysis of variance (ANOVA) or Wilcoxon.
 239 The means of mRNA abundance, cleavage and blastocysts were compared with Tukey-
 240 Kramer HSD or Duun test, respectively. Data were procedure with the JMP statistical
 241 software (SAS Institute, Cary, NC, USA). The data are presented as the mean \pm
 242 standard error of mean (S.E.M.). Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

243 For the total cell number, apoptosis cell number, TE and ICM staining, data were
 244 analyzed with ANOVA using the generalized linear mixed model (GLIMMIX)
 245 procedure with the SAS statistical software package (SAS Inst. Inc., Cary, NC, USA).
 246 All factors were considered to be fixed effects. If the ANOVA was significant, means
 247 were separated using PDIFF procedure. The data are presented as the least-squares
 248 mean \pm S.E.M. Differences were considered significant when $p \leq 0.05$.

249 Results

250 Cleavage and production of blastocysts

251 The percentage of cleaved embryos was determined on Day 3 of culture. The cleavage
 252 rate was similar ($P > 0.05$) among the groups (Table 2). However, the percentage of Day
 253 8 blastocysts was higher ($P < 0.0001$) in FBS group (Table 3).

254 **Table 2. Cleavage rates of embryos cultured in different media**

Group	No. of presumed zygotes	No. of cleaved embryos	Cleavage rate (% \pm s.e.m.)
-------	-------------------------	------------------------	--------------------------------

BSA	445	327	73.7±3.0
FBS	380	259	68.5±2.2
CM	745	509	70.6±2.5

255 ^A Nineteen rounds of IVF were performed.

256 **Table 3. Developmental rates of embryos cultured in different media**

257 ^{a-b} Values with different superscripts in the same column are significantly different ($P<.0001$)

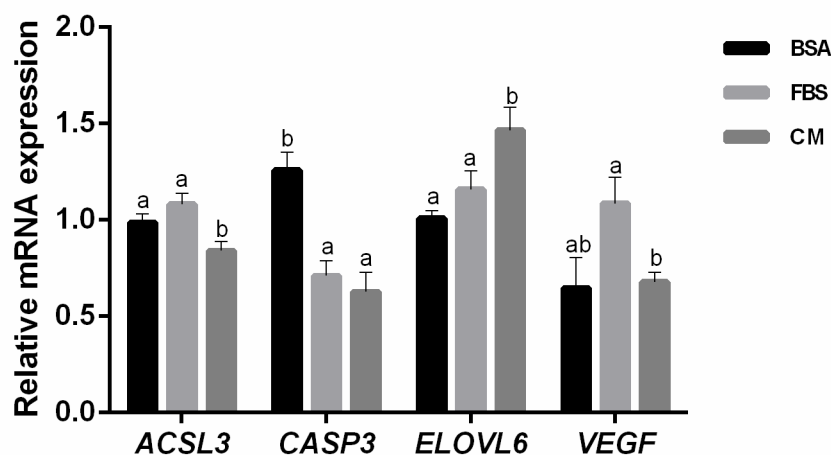
Group	No. of presumed zygotes	Total no. of blastocysts	Blastocyst rate (% ±s.e.m.)
BSA	595	148 ^a	25.1±2.2 ^a
FBS	529	201 ^b	39.7±2.3 ^b
CM	851	160 ^a	17.8±1.5 ^a

258 ^A Thirty three rounds of IVF were performed.

259 Messenger RNA expression of candidate genes

260 The mRNA levels for *ELOVL6* in Day 8 expanded blastocysts was higher ($P=0.118$) in
 261 CM group. The mRNA levels for *ACSL3* and *VEGF* in Day 8 expanded blastocysts
 262 were higher ($P=0.0162$, $P= 0.0407$ respectively) in the FBS group. Moreover, the
 263 mRNA levels of *CASP3* in Day 8 expanded blastocysts were higher ($P= 0.0013$) in the
 264 BSA group (Fig. 1). However, there were no difference ($P>0.05$) between the mRNA
 265 levels of *ACSL6*, *CPT1B*, *CDX2*, *POU5F1*, *IGFR1*, *EGFR*, *IFNT2*, *PLAC8*, *SOD2*,
 266 *HSP70* and *BAX* in in Day 8 expanded blastocysts in the BSA, FBS and CM groups
 267 (Table 4).

268



269

270 **Fig. 1.** Relative mRNA levels of various genes in blastocysts determined by RT-qPCR. Total RNA was
 271 extracted from 5 pools per group (3 expanded blastocysts/pool). Relative mRNA levels of *ACSL3*,

272 *CASP3*, *ELOVL6* and *VEGF* in Day-8 expanded blastocysts. Statistically significant differences are
 273 indicated: ^{a-b}, $P \leq 0.05$.

274 **Table 4. mRNA levels of genes did not differ**

Genes
<i>ACSL6</i>
<i>BAX</i>
<i>CDX2</i>
<i>CPT1B</i>
<i>EGFR</i>
<i>HSP70</i>
<i>IFNT2</i>
<i>IGFR1</i>
<i>PLAC8</i>
<i>POU5F1</i>
<i>SOD2</i>

275

276 Counting TE, ICM and apoptotic cells

277 The total number cells, the number of TE cells per blastocyst, the number of ICM cells
 278 per blastocyst and the TE:ICM cell ratio were similar ($P > 0.05$) between three groups
 279 CM, BSA and FBS (Table 5). Moreover, the apoptotic index is higher in FBS group, but
 280 did not significantly differ ($P > 0.05$) (Fig. 2).

281 **Table 5. Total cell number and numbers of TE and ICM cells in embryos cultured in**
 282 **different media**

283 TE, trophectoderm; ICM, inner cell mass. Fifteen expanded blastocyst per group were randomly selected. Values
 284 with different superscripts within the same column are significantly different ($P > 0.05$).
 285

Group	Total cell no.	No. of TE cells	No. of ICM cells	TE:ICM cell ratio	ICM (%)*	TE (%)*
BSA	55.8±6.1	36.6±4.9	19.1±1.6	2.0±0.1	34.4±1.7	65.5±1.7
FBS	55.6±5.9	35.9±4.7	19.7±1.6	1.8±0.1	35.9±1.6	64.0±1.6
CM	64.0±5.8	42.5±4.6	21.4±1.5	1.9±0.1	34.9±1.6	65.0±1.6

286 *Calculated based on the total cell number

287

288

289

290

291

292

293

294

295

296

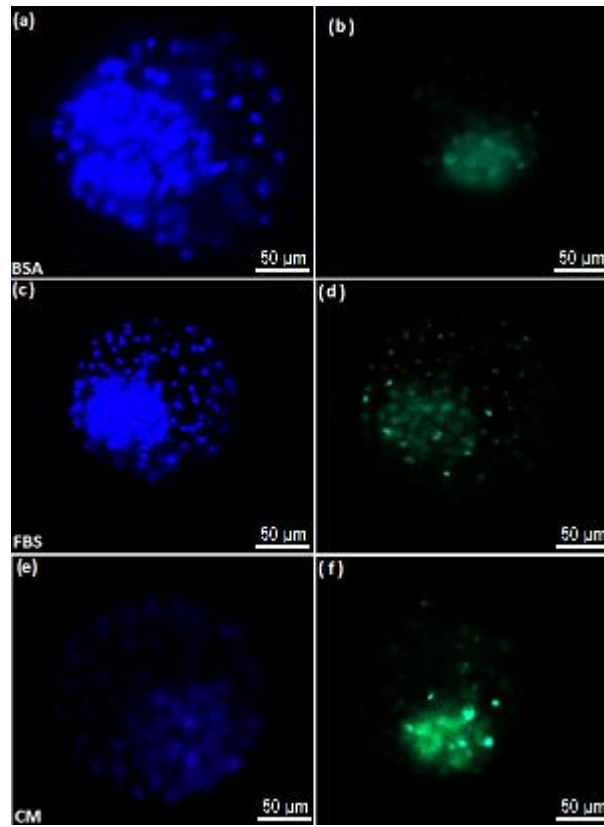
297

298

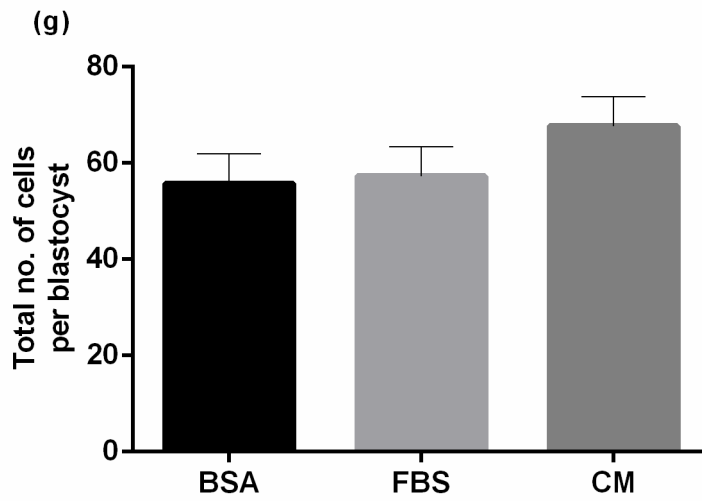
299

Hoechst 33342

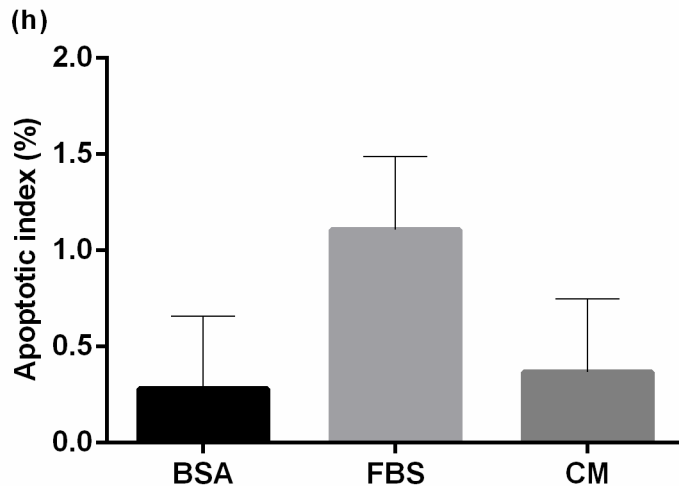
TUNEL



300
301
302



303



304
 305 **Fig. 2.** Day-8 expanded blastocysts were stained with Hoechst 33342 to determine the total cell number
 306 and TUNEL was performed to identify apoptotic cells. Embryos were cultured in the (a–b) BSA, (c–d)
 307 FBS and (e–f) CM groups. Scale bar 50 μ m. (g) Mean total cell numbers determined by Hoechst 33342
 308 staining. (h) Mean total apoptotic cell numbers determined by TUNEL.

309 **Discussion**

310 The present study is the first to use eMSC-CM during IVC bovine embryo (specific
 311 specie). Furthermore, most of the studies published conditioned the maturation and/or
 312 culture medium instead of using the basal medium supplemented with CM. In this study
 313 we used 20% of eMSCs-CM in the *in vitro* culture medium. Previous studies have
 314 shown that concentration of CM and EVs interferes in the blastocysts rate (Kim *et al.*
 315 2011; Park *et al.* 2013; Qu *et al.* 2018), as well as the concentration of cells in the co-
 316 culture (Nascimento, 2014; Miranda *et al.* 2016). Our findings show that the use of CM
 317 during IVC did not affect the apoptotic index and the relative expression for *CASP3*,
 318 although increased the total number of cells in blastocysts.

319 In the present study, when we used CM in combination BSA as alternative to serum for
 320 bovine embryo culture, the cleavage was similar among the groups, suggesting that the
 321 combination of CM and BSA served either as competence factors, which is in
 322 agreement with previous studies reported by Kim *et al.* (2011) and Nascimento (2014)
 323 who also used CM during IVC of bovine embryos. Ling *et al.* (2008) used CM during
 324 IVM of mouse oocytes and reported an increase in maturation rate. This indicates that
 325 the use of CM during IVM is more effective for follicular growth and oocyte
 326 maturation, but also did not observe a significant difference in cleavage or blastocyst
 327 rate.

328 It has already been reported that used of 10^4 cells in the co-culture increase the
329 blastocyst rate (Nascimento, 2014; Miranda *et al.* 2016). In this study, the percentage of
330 Day 8 blastocysts was higher in FBS group than in the BSA and CM groups. The
331 opposite was observed by Valente *et al.* (2016).

332 The concentration of total protein in CM is similar than in MSCs culture medium (Park
333 *et al.* 2013). The main hypothesis for the use of CM in IVP was that the factors
334 produced by MSCs could increase embryo production in terms of blastocyst rate or even
335 in embryo quality. Nevertheless, the excess of nutrients may inhibit bovine embryo
336 development during early embryonic stages (Kim *et al.* 2011). The optimal
337 concentration of CM is 10% and the day to supplement media is Day 4 (Park *et al.*
338 2013). In the present experiment, we observed that the use of 20% CM in the beginning
339 of IVC maintained the production of blastocysts.

340 The number of embryonic cells has been extensively used as an indicator of embryo
341 quality (Khurana & Niemann, 2000; Lequarre *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2005).
342 Embryos containing a greater number of cells are more likely to implant and develop
343 into live offspring (Van Soom *et al.* 2007). In the present study, the number of TE cells,
344 ICM cells and the total cell number per blastocyst were higher in CM group but did not
345 differ significantly. A previous study observed that the culture in serum-free medium
346 based on BSA typically generated blastocysts with higher total cell numbers (Kim *et al.*
347 2011; Park *et al.* 2013; Wydooghe *et al.* 2014; Mesalam *et al.* 2018).

348 However, to evaluate the embryo only based on total cell number is not sufficient. A
349 better way to evaluate embryo quality is through the apoptosis index, where a high
350 incidence of apoptosis is associated with a reduction in embryo viability (Byrne *et al.*
351 1999). Mesalan *et al.* 2018 reported a higher, but not significantly different, apoptosis
352 index in FBS group. The present study has shown the same data.

353 To investigate the effects of CM derived from eMSCs, the expression of genes related
354 to apoptosis, development and metabolism was studied in expanded blastocysts.
355 Alterations in gene expression may affect the viability of the embryo (Bertolini *et al.*
356 2002). The expression levels of *ACSL6*, *CPT1B*, *CDX2*, *POU5F1*, *IGF1R*, *EGFR*,
357 *IFNT2*, *PLAC8*, *SOD2*, *HSP70* and *BAX* were similar among the groups. Moreover, the
358 present experiment revealed a higher expression level of *ELOVL6* and *ACSL3* in CM
359 and FBS group, respectively. Both *ACSLs* and *ELOVLs* enzyme family members are

360 expected to be involved in the lipid metabolism of preimplantation bovine embryo
361 (Sudano *et al.* 2016).

362 Previous studies have shown that embryos cultured in the absence of FBS show
363 alteration of phosphatidylcholines (cell membrane constituent phospholipid) and higher
364 concentrations of oleic acid (Ferreira *et al.* 2010). Suggesting that CM potentially
365 induced the elongation of fatty acid, and thus favoring the metabolism of stearic and
366 oleic fatty acids. Moreover, these data corroborate with Sudano *et al.* (2016) reported an
367 increase in the relative expression of *ELOVL6* in morulas cultured with FBS but not at
368 the blastocyst stage.

369 It has previously been reported an increase in the relative expression of *ACSL3* in *in*
370 *vitro* bovine embryo cultured with FBS (Sudano *et al.* 2014). Moreover, Milazzotto *et*
371 *al.* (2016) reported a high lipid content in embryos with fast development at blastocyst
372 stage, which could be associate with a lower survival after cryopreservation (Abe *et al.*
373 2002). Studies should be performed to evaluate the survival of embryos cultured with
374 CM after cryopreservation.

375 Although the embryos cultured with BSA did not present high apoptosis index analyzed
376 by TUNEL, the mRNA expression of *CASP3* was higher in this group. This fact could
377 be associate probably due to the time that apoptosis occurs. TUNEL analyzed
378 fragmentation of DNA in the end of apoptosis, while *CASP3* is activated two events
379 before. These observations suggest that CM may contribute to embryo development
380 through suppression of apoptosis at the molecular level in preimplantation embryos
381 (Park *et al.* 2013).

382 Previous study by Park *et al.* (2013) analyzed different culture media and detected a
383 higher concentration of *VEGFA* in CM when compared to MSC and FBS. In contrast
384 the present experiment revealed an increase of mRNA expression of *VEGF* in FBS
385 group, which could be associated with the increase of blastocyst production rate. Our
386 results indicate that is possible to produce bovine embryos in the absence of FBS in the
387 culture medium.

388 **Conclusion**

389 In summary, our results show that CM can be used as an alternative supplement to FBS.
390 We observed a different gene expression profile, suggesting the CM inhibited an

391 increase in the relative mRNA levels for *CASP3*. Moreover, the CM favored the total
392 number cells, inhibited the percentage of cells in apoptosis and produces better quality
393 embryo.

394 **Conflicts of interest**

395 The authors declare no conflicts of interest.

396 **Acknowledgements**

397 This research was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível
398 Superior – CAPES – Brasil. We acknowledge Department of Pharmacology, Institute of
399 Bioscience, University of Sao Paulo State (UNESP) for their support.

400 **References**

401 Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., and Hoshi, H. (2002). Accumulation of cytoplasmic lipid
402 droplets in bovine embryos and cryotolerance of embryos developed in different culture systems
403 using serum-free or serum-containing media. *Mol. Reprod. Dev.* **61**, 57–66.

404 Ashiba, K., Terunuma, A., Terunima, H., Takane, T., Deng, X., Yamashita, Y., Watanabe, K.
405 (2015). Immortalized mesenchymal stem cells producing conditioned medium in a large scale
406 for therapeutic useage. *Inflamm. Regen.* **35**, 57–60.
407 <https://doi.org/10.2492/inflammregen.35.057>

408
409 Bertolini, M., Beam, S. W., Shim, H., Bertolini, L. R., Moyer, A. L., Famula, T. R., Anderson,
410 G. B. (2002). Growth, development, and gene expression by *in vivo*- and *in vitro*-produced day
411 7 and 16 bovine embryos. *Molecular Reproduction and Development*, [s.l.], **63**, 318-328. doi:
412 10.1002/mrd.90015

413
414 Byrne AT, Southgate J, Brison DR, Leese HJ. (1999). Analysis of apoptosis in the
415 preimplantation bovine embryo using TUNEL. *J Reprod Fertil.* **117**, 97–105.

416
417 Crosier, A. E., Farin, P. W., Dykstra, M. J., Alexander, J. E., Farin, C. E. (2004). Ultrastructural
418 morphometry of bovine blastocysts produced *in vivo* or *in vitro*. *Biology Reproduction Science.*
419 **84**, 169-177. pmid: 11319141

420
421 De Schauwer C, Goossens K, Piepers S, Hoogewijs MK, Govaere JL, Smits K, Meyer E, Van
422 Soom A, Van de Walle GR. (2014). Characterization and profiling of immunomodulatory genes
423 of equine mesenchymal stromal cells from non-invasive sources. *Stem Cell Res Ther.* **5**, 6. doi:
424 10.1186/scrt395

425
426 Donofrio G, Franceschi V, Capocéfalo A, Cavirani S, Sheldon IM. (2008). Bovine endometrial
427 stromal cells display osteogenic properties. *Reproductive Biology and Endocrinology.* **6**:65. doi:
428 10.1186/1477-7827-6-65

429
430 Everts, R. E., Chavatte-Palmer, P., Razzak, A., Hue, I., Green, C. A., Oliveira, R., Vignon, X.,
431 Rodriguez-Zas, S. L., Tian, X. C., Yang, X., Renard, J. P., Lewin, H. A. (2008). Aberrant gene
432 expression patterns in placentomes are associated with phenotypically normal and abnormal

433 cattle cloned by somatic cell nuclear transfer. *Physiological Genomics*. **33**, 65-67. doi:
434 10.1152/physiolgenomics.00223.2007
435
436 Ferreira CR, Saraiva SA, Catharino RR, Garcia JS, Gozzo FC, Sanvido GB, et al. (2010). Single
437 embryo and oocyte lipid fingerprinting by mass spectrometry. *J Lipid Res*. **51**, 1218-27. doi:
438 10.1194/jlr.D001768
439 Fouladi-Nashta AA, Alberio R, Kafi M, Nicholas B, Campbell KH, Webb R. (2005).
440 Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation
441 bovine embryos. *Reprod Biomed Online*. **10**, 497-502. pmid: 15901458
442
443 Gargett C.E., Schwab, K.E., Zillwood, R.M., Nguyen, H.P., Wu, D. (2009). Isolation and
444 culture of epithelial progenitors and mesenchymal stem cells from human endometrium.
445 *Biology of Reproduction*. **80**, 1136-1145. doi: 10.1095/biolreprod.108.075226
446
447 Holm, P., Booth, P. J., Schmidt, M. H., Greve, T., and Callesen, H. (1999). High bovine
448 blastocyst development in a static in vitro production system using SOFaa medium
449 supplemented with sodium citrate and myoinositol with or without serum proteins.
450 *Theriogenology*. **52**, 683–700. doi:10.1016/J.ANIREPROSCI.2005.05.022
451
452 Iglézias, José Carlos Rossini. (2004). Célula-tronco. *Revista da Faculdade de Ciências Médicas*
453 *de Sorocaba, Sorocaba*. **6**, 3-9.
454
455 Khurana, N. K., Niemann, H. (2000). Energy metabolism in pre implantation bovine embryos
456 derived *in vitro* or *in vivo*. *Biol Reprod*. **62**, 847–856. pmid: 10727252
457
458 Kim, E.Y., Lee, J.B., Park, H.Y., Jeong, C.J., Riu, K.Z., Park, S.P. (2011). The use of
459 embryonic stem cell derived bioactive material as a new protein supplement for the in vitro
460 culture of bovine embryos. *Journal of Reproduction and Development*. **57**, 346-354. pmid:
461 21289468
462
463 Lazzari, G., Wrenzycki, C., Herrmann, D., Duchi, R., Kruij, T., Niemann, H., Galli, C. (2002).
464 Cellular and molecular deviations in bovine *in vitro* produced embryos are related to the large
465 offspring syndrome. *Biology of Reproduction*. **67**, 767–775. pmid: 12193383
466
467 Lequarre, A.S., Marchandise, J., Moreau, B., Massip, A., Donnay, I. (2003). Cell cycle duration
468 at the time of maternal zygotic transition for in vitro produced bovine embryos: effect of oxygen
469 tension and transcription inhibition. *Biology of Reproduction*. **69**, 1707–1713. doi:
470 10.1095/biolreprod.103.017178
471
472 Lim, K. T., Jang, G., Ko, K. H., Lee, W. W., Park, H. J., Kim, J.J., Lee Hwang, W. S., Lee, B.
473 C., Kang, S. K. (2007). Improved in vitro bovine embryo development and increased efficiency
474 in producing viable calves using defined media. *Theriogenology*. **67**, 293–302. doi:
475 10.1016/j.theriogenology.2006.07.011
476
477 Ling, B., Feng, D.Q., Zhou, Y., Gao, T., Wei, H.M and Tian, G.Z. (2008). Effect of conditioned
478 medium of mesenchymal stem cells on the in vitro maturation and subsequent development of
479 mouse oocyte. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **41**, 978-985. pmid:
480 19039379
481
482 Lonergan, P.; Rizos, D.; Gutiérrez-Adán, A.; Moreira, P.M.; Pintado, B.; De La Fuente, J.;
483 Boland, M.P. (2003). Divergence of gene expression in bovine zygotes cultured to the
484 blastocyst stage *in vivo* or *in vitro*. *Biology of Reproduction*. **69**, 1424-31. doi:
485 10.1095/biolreprod.103.018168

486 Mesalam, A. et al. (2018). A combination of bovine serum albumin with insulin–transferrin–
487 sodium selenite and/or epidermal growth factor as alternatives to fetal bovine serum in culture
488 medium improves bovine embryo quality and trophoblast invasion by induction of matrix
489 metalloproteinases. *Reproduction, Fertility and Development*, [s.l.], n.p.
490 doi:<http://dx.doi.org/10.1071/rd18162>

491 Milazzotto, Marcella Pecora et al. (2016). Early cleavages influence the molecular and the
492 metabolic pattern of individually cultured bovine blastocysts. *Molecular Reproduction and*
493 *Development*. **83**, 324–336. <http://dx.doi.org/10.1002/mrd.22619>
494

495 Miranda, M.S., Nascimento, H.S., Costa, M.P.R., Costa, N.N., Brito, K.N.L., Lopes, C.T.A.,
496 Santos, S.S.D., Cordeiro, M.S., Ohashi, O.M. (2016). Increasing of blastocyst rate and gene
497 expression in co-culture of bovine embryos with adult adipose tissue-derived mesenchymal
498 stem cells. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. New York. **33**, 1395–1403. doi:
499 10.1007/s10815-016-0779-0

500

501 Moraes, C. N. de., Maia, L., Dias, M. C., Dell’Áqua, C. P. F., Mota, L. S. M. S. da., Chapwanya,
502 A., Landim-Alvarenga, F. C., Oba, E. (2016), Bovine endometrial cells: a source of
503 mesenchymal stem/progenitor cells. *Cell Biology International*. **40**, 1332– 1339. doi:
504 10.1002/cbin.10688

505

506 Nascimento, H. S. (2014). Co-cultivo de embriões bovinos com células-tronco adultas derivadas
507 de tecido adiposo. Universidade Federal do Para.1-64. No prelo.
508

509 Park, H., Kim, E., Lee, S., Choi, H., Moon, J.J., Park, M., Son, Y., Lee, J., Jeong, C., Lee, D.,
510 Riu, K. and Park S. (2013). Effect of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal-Stem-Cell
511 Bioactive Materials on Porcine Embryo Development. *Mol. Reprod. Dev.* **80**, 1035–1047. doi:
512 10.1002/mrd.22270

513

514 Parrish, J. J., Krogenaes, A., and Susko-Parrish, J. L. (1995). Effect of bovine sperm separation
515 by either swim-up or Percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic
516 development. *Theriogenology*. **44**, 859–869. doi:10.1016/0093-691X(95)00271-9
517

518 Parrish, J. J., Susjo-Parrish, J. L., Winer, M. A., and First, N. L. (1988). Capacitation of bovine
519 sperm by heparin. *Biol. Reprod.* **38**, 1171–1180. pmid: 3408784
520

521 Pereira, D.C., Dode, M.A.N., Rumpf, R. (2005). Evaluation of different culture systems on the
522 *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology*, **63**, 1131–1141. pmid: 15710198
523 pmid:10645250
524

525 Qu, Pengxiang et al. Extracellular vesicles derived from donor oviduct fluid improved birth
526 rates after embryo transfer in mice. (2018). *Reproduction, Fertility and Development*. [s.l.], n.p.
527 <http://dx.doi.org/10.1071/rd18203>
528

529 Rizos, D., Gutiérrez-Adan, A., Perez-Garnelo, S., De La Fuente, J., Boland, M. P., Lonergan, P.
530 (2003). Bovine embryo culture in the presence or absence of serum: implications for blastocyst
531 development, cryotolerance, and messenger RNA expression. *Biology of Reproduction*. **68**,
532 236–43. pmid: 12493719
533

534 Stenger EO, Krishnamurti L, Galipeau J. (2015). Mesenchymal stromal cells to modulate
535 immune reconstitution early post-hematopoietic cell transplantation. *BMC Immunology*. **16**, 1-
536 10. doi: 10.1186/s12865-015-0135-7
537

538 Sudano MJ, Caixeta ES, Paschoal DM, Martins A, Jr., Machado R, Buratini J, et al. (2014).
539 Cryotolerance and global gene-expression patterns of *Bos taurus indicus* and *Bos Taurus taurus*

540 *in vitro*- and *in vivo*-produced blastocysts. *Reproduction Fertility and Development*. **26**, 1129-
541 41. doi: 10.1071/RD13099
542
543 Sudano, Mateus J. et al. (2016). Lipidome signatures in early bovine embryo development.
544 *Theriogenology*. **86**, 472-484e.1. <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.03.025>
545 Thompson, J. G. (2000). *In vitro* culture and embryo metabolism of cattle and sheep embryos –
546 a decade of achievement. *Animal Reproduction Science*. **60-61**, 263-275. pmid: 10844200
547
548 Valente, J.V. (2016). Efeito do meio condicionado por células tronco mesenquimais derivadas
549 de tecido adiposo na maturação de oócitos bovinos e posterior desenvolvimento embrionário *in*
550 *vitro*. Universidade Federal do Para. 1-68. No prelo.
551
552 Van Soom, A., Vandaele, L., Goossens, K., de Kruif, A., and Peelman, L. (2007). Gamete
553 origin in relation to early embryo development. *Theriogenology*. **68**, S131–137.
554 doi:10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2007.03.019
555
556 Van Wagtenonk-de Leeuw, A.M., Aerts, .B.JG., Den Daas, J.H.G. (1998). Abnormal offspring
557 following *in vitro* production of bovine preimplantation embryos: a field study. *Theriogenology*.
558 **49**, 883-894. pmid: 10732097
559
560 Wydooghe, E., Heras, S., Dewulf, J., Piepers, S., Van den Abbeel, E., De Sutter, P., Vandaele,
561 L., and Van Soom, A. (2014). Replacing serum in culture medium with albumin and insulin,
562 transferrin and selenium is the key to successful bovine embryo development in individual
563 culture. *Reprod. Fertil. Dev.* **26**, 717–724. doi:10.1071/RD13043

Considerações Finais

Em seu conceito inicial, o presente trabalho surgiu como forma de contextualizar e maximizar os achados sobre a utilização de meio condicionado por células tronco mesenquimais na produção *in vitro* de embrião. Deste modo, em primeiro plano, esperávamos que aumentasse a taxa de produção de blastocistos a partir do uso de meio condicionado em relação ao SFB, já que as CTM produzem inúmeros fatores de proliferação celular. Apesar de observarmos aumento no número total de células do embrião, não obtivemos aumento na taxa de produção.

Além disso, dados do presente estudo sugerem que o embrião produzido a partir de MC é de qualidade superior, uma vez que o MC inibiu fatores apoptóticos.

Estudo como a proteômica dos embriões deve ser realizado para que os dados de expressão gênica possam se concretizar. Ademais, deve-se fazer o mesmo experimento comparando diferentes concentrações de suplementação.