

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 06/06/2019.

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.

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.