



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**JULIANA VIEITAS VALENTE**

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NA MATURAÇÃO DE  
OÓCITOS BOVINOS E POSTERIOR DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN*  
*VITRO.***

2016

**JULIANA VIEITAS VALENTE**

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NA MATURAÇÃO DE  
OÓCITOS BOVINOS E POSTERIOR DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN*  
*VITRO*.**

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

**Orientador: Prof. Dr. Moysés dos Santos Miranda**

**BELÉM-PA  
JULHO/2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFPA

---

Valente, Juliana Vieitas, 1985-

Efeito do meio condicionado por células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo na maturação de oócitos bovinos e posterior desenvolvimento embrionário in vitro / Juliana Vieitas Valente. - 2016.

Orientador: Moyses dos Santos Miranda.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Belém, 2016.

1. Reprodução Animal. 2. Células tronco - Embrião. 3. Fertilização in vitro. I. Título.

CDD 22. ed. 636.0824

**JULIANA VIEITAS VALENTE**

**EFEITO DO MEIO CONDICIONADO POR CÉLULAS TRONCO  
MESENQUIMAIS DERIVADAS DE TECIDO ADIPOSEO NA MATURAÇÃO DE  
OÓCITOS BOVINOS E POSTERIOR DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO *IN*  
*VITRO*.**

**Data da aprovação: 29 de Julho de 2016.**

**Banca Examinadora:**

---

**Drº Moysés dos Santos Miranda (Orientador)**  
**(Instituto de Ciências Biológicas - UFPA)**

---

**Profª Drª Simone do Socorro Damasceno Santos**  
**(Instituto de Ciências Biológicas - UFPA)**

---

**Prof. Dr. Chubert Bernardo Castro Sena**  
**(Instituto de Ciências Biológicas - UFPA)**

---

**Profº Drª Nathália Nogueira da Costa de Almeida**  
**(Faculdade Integrada Brasil Amazônia - FIBRA)**

*Dedico este trabalho aos meus pais*

*SEBASTIÃO E ANA e ao meu filho*

*VITOR VALENTE*

*Vá firme na direção da sua meta*

*Porque o pensamento cria, o desejo atrai*

*E a fé realiza.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar nos momentos difíceis, me dar força interior para superar todas as dificuldades pessoais e profissionais (que foram muitas), mostrar os caminho nas horas incertas e me suprir em todas as minhas necessidades.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo ao longo desta caminhada. Em especial a minha mãe Ana Lucia que abdicou de tudo para cuidar do meu filho nos momentos em que estive ausente para concretizar essa conquista.

Ao meu marido Diego Benvindo, por está sempre a meu lado, me incentivando, me fazendo rir e fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado.

A todos os colegas IC's e voluntários do laboratório LabFiv, pelos momentos divididos juntos, pelo apoio e pelas inúmeras gargalhadas a cada vez que recomeçava meu experimento. Em especial a minha amiga Marcy que em suas orações sempre pedia por mim (“Meu Jubileu Dourado”). Meu grande amigo Paulintinho por ter iniciado comigo a luta no cultivo celular, as idas e vindas do matadouro com muitas gargalhadas e algumas “cabeças de bois” para contar histórias no futuro e por me ensinar os primeiros passos no cultivo celular. As amigas Ale e Pri Ramos duas profissionais extremamente inteligentes e dedicadas ao trabalho, duas amigas que eu sempre vou levar no meu coração. Obrigada meninas!

Muitos finais de semanas, feriados, “férias” nós estávamos juntas em laboratório trabalhando, vocês não só são profissionais extremamente competentes e comprometidas com o trabalho...vocês são dois anjos que DEUS colocou em minha vida para que eu pudesse concretizar meu trabalho, **MAYRA** e **PRISCILINHA** devo a vocês todo conhecimento adquirido durante esses longos 12 meses que tive para concluir o mestrado. **MUITO OBRIGADA.**

A professora Dr<sup>a</sup> Simone Damasceno por ser esta mulher dedicada ao trabalho, VERDADEIRA, engraçada e inspiradora que és. Sempre com ótimas histórias e excelentes conselhos durante aquele cafezinho no final de tarde. Obrigada prof<sup>a</sup> tenho a senhora como inspiração para minha vida profissional e pessoal.

Ao professor Dr. Ohashi por sempre abrir as portas do laboratório, pelas conversas informais sobre meu trabalho e pelas valiosas sugestões.

Um agradecimento mais que especial ao Prof. Dr. **MOYSÉS DOS SANTOS MIRANDA**, você me deu uma oportunidade quando eu mais precisei, acreditou em mim e nas minhas capacidades, e por tudo isso lhe agradeço. Mas agradeço também por tudo que me ensinou, pela paciência que demonstrou desde o início e por nunca ter desistido de mim. A sua missão vai muito além da missão de um professor, você é um verdadeiro mestre que consegue despertar o interesse e a curiosidade de um modo único. Serei eternamente grata ao senhor.

## LISTA DE ABREVIATURAS

**6-DMAP**- 6- dimetil-amino-purina  
**AMP** - Monofosfato cíclico de adenosina  
**ANOVA** - Análise de variância  
**bFGF** -Basic fibroblast growth factor  
**BSA** - Albumina Sérica Bovina  
**CCOs** - Complexos cumulus-oócitos  
**CIV** - Cultivo *in vitro*  
**CSF** – Fator citosólico  
**CT** - Células Tronco  
**CTHe** - Célula tronco hematopoiética  
**CTMMO**- Célula tronco derivada da medula óssea  
**DMSO** - Dimethyl Sulfoxide  
**EGF** - Epidermal growth factor  
**FGF-10** - Fator de crescimento fibroblástico-10  
**FIV** - Fecundação *in vitro*  
**MPF**- Fator Promotor de Maturação  
**FSH** - Hormônio Folículo Estimulante  
**HCG** - Gonadotrofina coriônica humana  
**IETS** - Sociedade Internacional de Transferência de Embriões  
**IFN- $\gamma$** - Interferon-gama  
**IGF**- Fator de crescimento semelhante à insulina  
**ISCT**- Sociedade Internacional de Terapia celular  
**KT**- Kit ligante  
**LH** - Hormônio Luteinizante  
**MAP**- Proteína ativada por mitógeno  
**MIV** - Maturação *in vitro*  
**mRNA** - Messenger RNA  
**MSC** - Célula tronco mesenquimal  
**MSC-*adb*** - Células tronco mesenquimal derivada de tecido adiposo bovino  
**OPU**- Oviun pick up bovino  
**PBS** - Phosphate buffered Saline  
**PIVE** - Produção *in vitro* de Embriões  
**PMSG** - Gonadotrofina coriônica do soro de égua prenhe  
**rpm** - Rotações por minuto  
**SFB** - Soro Fetal Bovino  
**SOCIPE** - Sociedade Cooperativista dos Pecuaristas  
**SOF** - Synthetic Oviduct Fluid  
**TALP** - Tyrodes com Albumina, Lactato e Piruvato  
**TCM-199** - Tissue Culture Medium – 199  
**VEGF**- Fator de Crescimento Endotélio Vascular  
**VG**- vesícula germinativa  
**VGBD**- Rompimento do Envelope nuclear

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1</b> – Maturação nuclear de oócitos bovinos maturados por 24 horas em meio de MIV condicionado com MSC-adb, através da visualização do 1º corpúsculo polar nos quatro grupos experimentais. ....	48
<b>Tabela 2</b> - Taxas de clivagem, formação e eclosão de embriões bovinos oriundos de oócitos maturados <i>in vitro</i> em meio de MIV condicionado por MSC-adb.....	51

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Produção de embriões bovinos no Brasil entre os anos de 2006.....19
- Figura 2:** Oócito em estágio de VG rodeado pelas células da granulosa onde após uma onda de LH ocorre a redução do AMP e ativação do Fator Promotor de Maturação resultando na GVBD e acumulando astes de microtubulos ao redor da cromatina condensada. Detalhe do fuso meiótico em metáfase I e a estrutura do centríolo/centrossomo (figura 2A). Detalhe do fuso meiótico em telófase I, em que podemos ver os microtúbulos entre os conjuntos cromossômicos .....23
- Figura 3:** Esquema representando a origem embrionária e adulta, a potencia: totipotente encontrada apenas no zigoto, pluripotentes encontrada na massa interna do blastocisto, multipotentes encontradas em diversas partes do corpo do individuo adulto podendo ser hematopoiética ou mesenquimal, sendo a mesenquimal diferenciada em tecidos adiposo, ósseo e cartilaginoso.....26
- Figura 4:** O tecido adiposo se localiza abaixo da camada de pele e entre e tecido muscular e o nicho das Células tronco mesenquimais está localizada na região perivascular, sendo composto pelos vasos sanguíneos em associação com células de tecido conjuntivo, adiposas, estromais e diversos progenitores.....28
- Figura 5:** Esquema de modulação paracríma da MSC-ad, ao secretar microvesículas contendo biomoléculas para o meio externo para que atinja a célula alvo de forma a modular um microambiente. ....30
- Figura 6:** Descrição geral do experimento, detalhando a etapa de cultivo de células tronco mesenquimais a partir do tecido adiposo. Na passagem P4 foi feita Imunofenotipagem (A) Curva de crescimento (B), Diferenciação (C) e na passagem P3 foi realizado o condicionamento do meio de maturação em 24, 48 e 72 horas (D), para posterior utilização na etapa de MIV da PIVE bovino.....33
- Figura 7:** Cultivo de células tronco mesenquimais aderidas ao fundo da placa apresentando morfologia similar a fibroblastos.....39
- Figura 8:** Curva de crescimento de células tronco MSC-ad na passagem P4.....40
- Figura 9:** Morfologia do crescimento celular nas seis avaliações. 1º avaliação (A), 2º avaliação (B), 3º avaliação (C), 4º avaliação (D), 5º avaliação (E) e 6º avaliação (F).....41
- Figura 10:** Células tronco cultivadas e diferenciadas na P4 nos três tipos celulares aos 21 dias de indução. Tecido adipogênico (A), Tecido osteogênico(B) e tecido condrogênico (C).....42

<b>Figura 11:</b> Análise morfológica de crescimento das células inicialmente cultivadas em meio DMEM (A), 24 horas em meio de MIV (B), 48 horas em meio de MIV (C) e 72 horas em de MIV (D).....	45
<b>Figura 12</b> – Extrusão do 1º corpúsculo polar em oócitos maturados em meio de MIV controle (A), oócitos selecionados para maturação nos meios de MIV condicionados Cond-24 (B), Cond-48 (C) e Cond-72 (D).....	47
<b>Figura 13:</b> Clivagem por ativação partenogenética nos grupos controle(A), cond.24 horas (B), cond-48 horas(C), cond-72 horas(D).....	49
<b>Figura 14:</b> Avaliação da qualidade de embriões partenogenéticos avaliados ao sétimo dia após ativação partenogenética nos grupos controle (A), cond.24 horas (B), cond-48 horas(C), cond-72 horas(D).....	50

## RESUMO

As células tronco são conhecidas por suas propriedades de auto-renovação, diferenciação em diversas linhagem celulares e capacidades imunomoduladores, além de expressarem um grande número de moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, citocinas e receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células. Podem ser isoladas de vários tecidos, porém as células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo (MSC-ad) apresentam como vantagens a facilidade de isolamento, alto rendimento e baixa morbidade. Baseado nisso, a hipótese deste trabalho é verificar se o uso de meio condicionado pelas MSC-ad na maturação *in vitro* tem efeito sobre a as taxas de desenvolvimento de embriões bovinos. Para tanto, foi feito o isolamento e em seguida o cultivo de MSC-ad de origem bovina que se estendeu até a passagem três (P3) em meio de cultivo DMEM, suplementado com bicarbonato de sódio, 10% Soro fetal bovino (SFB), 50µl/mL de gentamicina. Quando os cultivos atingiram a confluência de 70% o meio foi substituído por TCM199 suplementado com 0.2 mM de piruvato, 50 µl/ml de gentamicina e 10% de SFB (meio de MIV). As MSC-ad foram condicionadas com meio TCM199 suplementado pelo período de 0 (Grupo CONTROLE), 24 (grupo COND-24h), 48 (grupo COND-48h) e 72 horas (grupo COND-72h), sendo que ao fim de cada período, o meio sobrenadante foi retirado, filtrado, aliquotado e congelado a -20<sup>o</sup> C. O meio foi descongelado somente no dia da MIV, e suplementado com 0,5 µl de PMSG (concentração 7UI/MI) e 0,5 µl de HCG. Ovários de abatedouro foram puncionados para obtenção de complexos cumulus oophurus (CCOs) que foram maturados por 24 horas em microgotas de meios condicionados sob óleo mineral e incubados em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> com 38,5° C. A avaliação da maturação nuclear foi feita com 22 horas, em seguida realizada a ativação partenogenética somente dos oócitos que exibiam corpúsculo polar com concentração em 50 µM de ionomicina por 5 minutos, inativação com TCM199-Hepes saturado com 0,03g de BSA, seguida de incubação por 3 horas em microgotas de 2mM de 6-DMAP. Após esse período as partenogêneses foram transferidas para migrogotas de meio de cultivo *in vitro*. As taxas de desenvolvimento foram avaliadas no segundo e sétimo dia após a ativação. Os resultados foram analisados por ANOVA e pós-teste de Fisher adotando nível de significância de 5%. Para os grupos experimentais CONTROLE, COND-24h, COND-48h e COND-72h, obtivemos os seguinte

resultados, respectivamente: 83.7, 77.7, 81,4 e 76.1% de maturação nuclear; 87.5, 86,9, 74 e 80.3% de clivagem e 23.8, 27.5, 18 e 19.6% de formação de blastocisto. Não houve diferença estatística entre os grupos experimentais condicionados ( $p>0.05$ ). Porém, as taxas de blastocisto foram menores quando comparadas ao meio de MIV fresco (42.1%) ( $p<0.05$ ). Isto sugere que o condicionamento ou o congelamento do meio afetou a sua eficiência. Estudos futuros deverão ser realizados para avaliar os níveis dos fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas secretadas no meio de MIV.

Palavra chave: Produção in vitro de embriões; células tronco; reprodução animal.

### **ABSTRACT**

Stem cells are known for their property of self-renewal, differentiation into various cell lineages and immunomodulatory capabilities, in addition to express a large number of adhesion molecules, extracellular matrix proteins, cytokines and growth factor receptors, allowing interactions with other cells. They can be isolated from various tissues, but adult stem cells derived from adipose tissue stroma (MSC-d) have the advantage of being easily isolated, high yield and low morbidity. Based on this, the study hypothesis is to verify the effect of MSC-ad conditioned medium use in in vitro maturation on development rates of bovine embryos. To this end, bovine MSC ad were isolated then cultivated until the passage three (P3) in DMEM culture medium, supplemented with sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum (FBS), 50mL / mL gentamicin. When cultures reached 70% confluency, the medium was replaced with TCM199 supplemented with 0.2 mM pyruvate, 50 ul / ml gentamicin and 10% FBS (IVM medium). The MSC-ad were conditioned with medium TCM199 supplemented for a period of 0 (Control Group), 24 (COND-24 group), 48 (COND-48h group) and 72 hours (COND group-72h), wherein the end of each period, the supernatant medium was removed, filtered, aliquoted and frozen at -20 0 C. The medium was thawed only on MIV day, and supplemented with 0.5 uL of PMSG (concentration 7 IU / ml) and 0.5 uL of HCG. Slaughterhouse ovaries were punctured to obtain oophorus cumulus complexes (COCs) were matured for 24 hours in microdrops of conditioned mediums under mineral oil them incubated in an incubator at 5% CO 2 at 38.5 ° C. Nuclear maturation assessment was performed with 22 hours, then held

parthenogenetic activation of only oocytes that exhibited polar body concentration of at least 50 uM ionomycin for 5 minutes, inactivation with TCM199-Hepes 0.03g saturated with BSA, followed by incubation for 3 hours microdroplets 2mM 6-DMAP. After this period, the parthenogenesis were transferred as microdrops to a culture medium in vitro. development rates were evaluated in the second and seventh days after activation. The results were analyzed by ANOVA and Fisher's post-test adopting a significance level of 5%. For groups: Experimental CONTROL, COND-24, COND-48h and 72h-COND, we obtained the following results respectively: 83.7, 77.7, 81.4 and 76.1% of nuclear maturation; 87.5, 86.9, 74 and 80.3 and 23.8% cleavage, 27.5, 18 and 19.6% of blastocyst formation. There was no statistical difference between conditioned experimental groups ( $p < 0.05$ ). However, blastocyst rates were lower when compared with fresh IVM medium (42.1%) ( $p < 0.05$ ). This suggests that the efficiency was affected by the conditioning of the medium or freezing. Future studies should be conducted to assess the levels of growth factors, cytokines and chemokines secreted in IVM medium.

Keyword: *in vitro* embryo production, mesenchymal stem cells, animal reproduction.

## SUMÁRIO

<b>1-INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2- REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
<b>2.1 Produção in vitro de embriões em bovino</b> .....	18
<b>2.2.2 Maturação in vitro</b> .....	20
<b>2.2.1 Maturação nuclear</b> .....	21
<b>2.3 Ativação partenogenética</b> .....	23
<b>2.4 Enriquecimento do meio de maturação</b> .....	24
<b>2.5 Células tronco</b> .....	25
<b>2.5.1 Células tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo (ctms-ad)</b> .....	27
<b>2.6 Relação da MIV e células tronco</b> .....	30
<b>3-HIPÓTESE</b> .....	31
<b>4-BJETIVOS</b> .....	31
<b>4.1 Objetivo geral</b> .....	31
<b>4.2 Objetivos específicos</b> .....	31
<b>5- MATERIAL E MÉTODO</b> .....	32
<b>5.1 Delineamento experimental</b> .....	32
<b>5.2 Obtenção e isolamento das células troncos derivada do tecido adiposo</b> .....	33
<b>5.2.1 Diferenciação celular</b> .....	35
<b>5.3 Curva de crescimento celular</b> .....	36
<b>5.4 Condicionamento do meio de maturação com células tronco MSC'S-adb</b> .....	36
<b>5.5 Obtenção dos ovários e seleção de oócitos</b> .....	36
<b>5.5.1 Maturação in vitro- MIV</b> .....	37
<b>5.5.2 Ativação partenogenética</b> .....	37
<b>5.5.3 Cultivo in vitro</b> .....	37
<b>5.7 Análise Estatística</b> .....	38
<b>6- RESULTADOS</b> .....	38
<b>6.1 Isolamento e caracterização morfológica das msc-ad de bovino</b> .....	38
<b>6.2 Curva de crescimento celular</b> .....	39
<b>6.3 Diferenciação das MSC-adb</b> .....	43
<b>6.4 Condicionamento das MSC-adb em meio de MIV</b> .....	44

6.5 PIVE.....	45
9. <b>DISCUSSÃO</b> .....	52
10 <b>CONCLUSÃO</b> .....	54
11. <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	56

## 1. INTRODUÇÃO

Há décadas busca-se melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos comerciais bovinos através de técnicas e da elaboração de protocolos voltados à aplicação de biotécnicas reprodutivas. A produção *in vitro* de embriões (PIVE) se consolidou e avançou rapidamente, sendo definitivamente incorporada aos programas comerciais de produção de embriões bovinos após o desenvolvimento de punção folicular (PF) e a técnica de transferência de embrião (Gottardi, 2009). A PIVE é uma das biotécnicas reprodutivas mais utilizadas na espécie bovina envolvendo as etapas de maturação, fertilização e cultivo até o estágio de blastocisto, de forma a simular *in vitro* o processo de desenvolvimento embrionário *in vivo*.

A PIVE é considerada uma biotécnica primordial da qual derivam outras biotécnicas, como por exemplo, a clonagem, transferência de embrião, inseminação artificial, entre outras, fazendo com que estudos nessa área sejam aprimorados constantemente (Junior, 2014). O crescimento desta biotecnologia (PIVE) no Brasil permitiu sua aplicação em larga escala e a exportação desse modelo para vários países latino-americanos e outros continentes (Bols, 2012).

Devido a essa expansão mundial, pesquisas em todas as etapas que compreendem a PIVE, são extremamente importantes para a própria evolução da biotécnica (Marciel, 2012). A PIVE é um processo constituído por três etapas que tentam simular artificialmente todos os eventos biológicos que ocorrem no aparelho reprodutor da fêmea com o objetivo de produzir embriões até a fase pré-implantacional. Dentre as etapas que compreendem o processo de PIVE temos a etapa de maturação *in vitro* (MIV), onde ocorrer completa maturação oocitária para que o oócito torne-se competente, através de mudanças, que devem ocorrer de forma simultânea e ordenada no núcleo e no citoplasma (Monica, 2016). Para a fertilização *in vitro* (FIV), os oócitos devem estar competentes e os espermatozóides capacitados para que ocorra a união entre os gametas e a formação do zigoto (Machaty *et. al.*, 2012). Por fim, no cultivo *in vitro* (CIV) devem ocorrer as divisões mitóticas das células zigóticas e a completa formação do embrião até a fase de blastocisto (Gordon, 2003).

Além de sua aplicação comercial, outra utilidade desta técnica é estudar os processos morfofisiológicos e bioquímicos do desenvolvimento embrionário pré-implantação. Embora a técnica tenha evoluído muito desde 1980 quando foi estabelecida em bovinos, ainda há muito que se aprender para a melhoria da qualidade do embrião produzido *in vitro*, considerando sua qualidade inferior comparada ao embrião produzido *in vivo* (Junior, 2014).

Sabe-se que os oócitos e embriões são extremamente vulneráveis a todas as mudanças que ocorrem ao meio em que são expostos, podendo comprometer a eficiência da biotécnica (Niemann e Wiemanne, 2000; Duranthon *et. al.*, 2008). Vários fatores influenciam a PIVE: qualidade oocitária, presença ou não de co-cultivo, quantidade de embriões cultivados por volume de meio, composição do meio e atmosfera gasosa (Kurama, 2012; Niemann e Wiemanne, 2000) entre outros. Foi observado que a inadequada maturação do oócito reflete em taxas reduzidas de fecundação e menor desenvolvimento embrionário, podendo ser explicado pela falha na maturação nuclear, citoplasmática e molecular do oócito (Chaves, 2010). Neste sentido, atualmente, alguns estudos tentam cinzelar a etapa de MIV e por consequência a competência oocitária para se tornar embrião no processo de PIVE. A utilização de inibidores da maturação nuclear (Adona, 2006), a adição de suplementos como vitaminas, antioxidantes (Viana, 2011), e hormônios (Costa *et. al.*, 2015) ao meio de maturação, entre outros, são exemplos de algumas pesquisas desenvolvidas com a finalidade de aprimorar o protocolo, melhorando a maturação e consequentemente o desenvolvimento embrionário.

Células tronco são células que podem se diferenciar em diversos tipos celulares, possuem propriedades imunomoduladoras e secretam fatores bioativos que colaboram na manutenção e reparo e/ou substituição de células danificadas ou perdidas no corpo (Souza, 2010; Galindo 2011; Zuttion, 2013,). O interesse nesse grupo celular vem aumentando constantemente devido a suas propriedades e possíveis aplicações na medicina regenerativa e terapia celular. De acordo com sua origem e plasticidade elas podem ser divididas em dois tipos principais: embrionárias (totipotentes e pluripotentes) e de origem adulta (multipotentes). Devido a facilidade de obtenção, a ausência de problemas éticos inerentes

aos embriões e a sua grande plasticidade, as células tronco de origem adulta vem sendo cada vez mais requisitadas e estudadas (Sá, 2012; Nascimento, 2014b).

As CT de origem adulta podem se do tipo hematopoiética (CTHe) e mesenquimal (MSC), esta última definida como uma população presente em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades e tem como características seu fácil isolamento e cultivo, seu potencial de diferenciação, produção de fatores de crescimento, citocinas e inibir a apoptose (Amorim, 2012). As MSC's podem ser obtidas a partir do tecido adiposo (MSC-ad) extraídas de diversas espécies inclusive a partir de bovinos e bubalinos (Morrini, 2009; Silva, 2013a), pois, o organismo dessa espécie possui grande reserva desse tecido, que, por sua vez, é obtido em grandes quantidades por meio de métodos simples de coleta.

A modulação de microambientes por parte das CT tem sido observada em diversos estudos e especula-se que sejam os fatores principais por trás do sucesso reportado em alguns estudos de terapia celular, mais até do que a própria diferenciação. (Silva, 2009b; Blaglio, 2012; Kapur, 2013). Também representam uma fonte de secreção de fatores endócrinos e parácrinos, tais como proteínas, ácidos graxos, hormônios e prostaglandinas (Bauer-Kreisel *et. al.*, 2010).

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1- PIVE EM BOVINOS**

Após um amplo e consolidado conhecimento sobre a obtenção de embriões *in vivo*, o Brasil passou a dominar a aspiração folicular ou *ovum pick up* (OPU) e a PIVE, ocupando uma posição importante no mercado mundial de embriões bovinos (Figura 1), sobretudo, por possuir o maior rebanho comercial do mundo e ser o principal exportador de carne bovina (Viana, 2012). Em relação à região Norte, o estado do Pará representa 42% do gado bovino (8,6% do rebanho total nacional), tendo São Felix do Xingu e Altamira como as maiores cidades do estado em produção de gado bovino (IBGE, 2011).

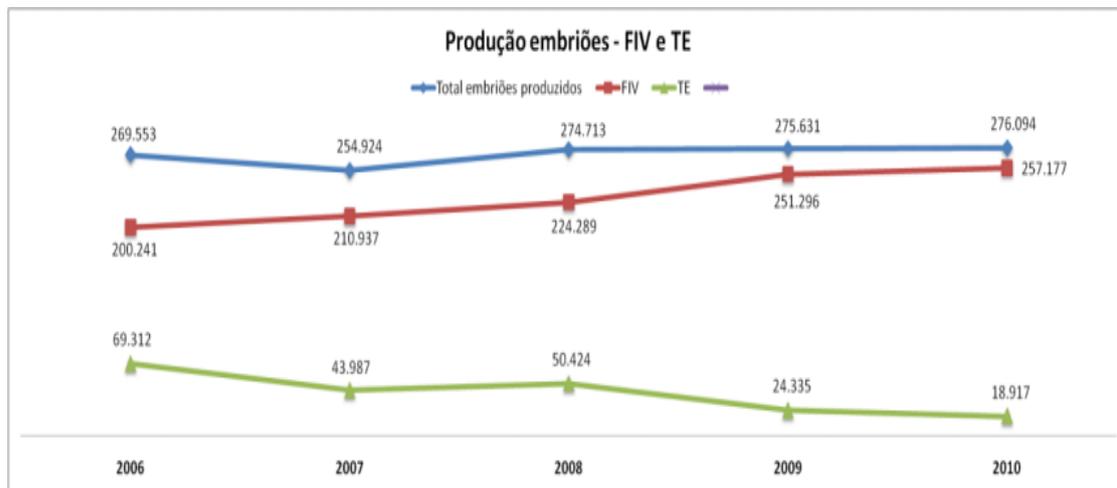


Figura 1: Produção de embriões bovinos no Brasil entre os anos de 2006 a 2010 (Fonte: Silva, 2011).

Atualmente, o Brasil é um dos países que mais produz e utiliza a tecnologia de PIVE no mundo. No ano de 2012 o país produziu 349.171 embriões *in vitro* de um total de 355.205 embriões produzidos na América do Sul, representada pela Argentina, Brasil e Panamá na América Central, pela técnica OPU (MAPA, 2012). A PIVE compreende três etapas, sendo a MIV, em seguida a FIV e por último a CIV até os estádios de mórula e blastocisto, quando os embriões poderão ser transferidos para receptoras previamente sincronizadas ou criopreservados em nitrogênio líquido para uso posterior (Frigoni, 2014).

Tendo em vista que os oócitos maturados *in vitro*, quando comparados aos *in vivo*, apresentam menores taxas de formação de blastocisto após a fecundação e o cultivo *in vitro* (Takagi *et. al.*, 2001), acredita-se que estes resultados se devem principalmente ao baixo potencial de desenvolvimento dos oócitos destinados à PIVE (Watson, 2007), isso pode ser determinado por causas distintas, tais como: fatores ambientais e inerentes ao próprio sistema de PIVE, que atuam sobre todas as suas etapas (maturação, fecundação e cultivo); ou ainda a remoção do oócito do ambiente folicular, com conseqüente perda da interação morfológica, hormonal e molecular entre oócito e células foliculares (Gottardi, 2009).

A soma destes fatores determina o prejuízo na qualidade e competência oocitária, levando à baixa produção de blastocistos, quando comparada obtida in vivo. Muitos fatores biológicos agem de forma conjunta para preparar o oócito imaturo para um desenvolvimento bem sucedido e um embrião competente após fecundação. Acredita-se que MIV seja a etapa mais limitante da PIVE, pois, é nessa etapa que o oócito adquire a competência nuclear, molecular e citoplasmática para posterior desenvolvimento embrionário (Mingoti, 2005; Moussa *et al.*, 2015). Devido a estes fatores, é possível afirmar que grande parte dos aprimoramentos que possam acontecer durante a PIVE de bovinos, possam ser alcançados pelo aperfeiçoamento da primeira etapa, a MIV, de formar a aumentar as taxas de produção de embriões e conseqüentemente de gestações e nascimentos.

## 2.2. Maturação in vitro (MIV)

Do ponto de vista meiótico, a envoltório oocitária nos mamíferos é a seqüência de eventos que ocorrem desde o estágio de vesícula germinativa (VG) (meiose I) até o término da segunda divisão meiótica, com formação do segundo corpúsculo polar (Blanco *et al.*, 2011). Nesta fase, o oócito produz reservas bioquímicas que serão responsáveis pela manutenção do desenvolvimento inicial até a ativação dos genes do embrião. Portanto, é durante esta fase de desenvolvimento que o oócito atinge sua capacidade plena e, devido a este fato, o termo “capacitação oocitária” foi sugerido (Hyttel *et al.*, 1997).

Via de regra, os protocolos atuais de MIV são eficientes em promover a progressão meiótica dos oócitos do estágio de prófase I até o estágio de metáfase II, porém, já está muito claro que durante o período da MIV o oócito deve passar por uma série de mudanças nucleares, citoplasmáticas e moleculares, que em conjunto os tornam competentes para a posterior fertilização ou ativação partenogenética seguido pelo desenvolvimento embrionário (Van Den Hurk & Zhao, 2005; Sánchez & Smitz, 2012).

Os oócitos maturados são mantidos no estágio de metáfase II devido à presença do Fator Promotor de Maturação (MPF) e da proteína ativada por mitógeno (MAP) promovendo a ruptura da membrana nuclear e manutenção da cromatina condensada

(Verlhac *et. al.* 1994; Yang *et al.*, 1994; Homa, 1995, Meujer e Pondervam, 1998). Para que o oócito em estágio de metáfase II retome seu desenvolvimento, é necessário que alterações morfológicas e bioquímicas induzida pela presença do espermatozoide ou por estímulo artificial em um processo conhecido como ativação partenogenética (Kupker *et al.*, 1998). Ambas promovem alterações na concentração de cálcio intracelular e diminuição da atividade de MPF e da MAP, culminando em exocitose dos grânulos corticais, endurecimento da zona pelúcida, formação dos pronúcleos e início das mitoses (White e Yue, 1996; Kupker *et. al.*, 1998).

A comunicação entre as células da granulosa e o oócito é essencial para a foliculogênese, o crescimento e maturação oocitária (Gilchrist, 2004). Existem evidências de que fatores secretados pelas células do cumulus são também importantes para a promoção da maturação citoplasmática do oócito (Tanghe *et al.*, 2003) e a aquisição da competência para o desenvolvimento embrionário (Hashimoto e Kishimoto, 1998; Gilchrist *et al.*, 2008) , seja diretamente pela síntese e transferência de moléculas para o interior dos oócitos através das “junções do tipo Gap”, da secreção de fatores solúveis ou ainda pela ação indireta de redução de radicais livres presentes no meio (Hashimoto et al., 1998). As células do cumulus também têm uma importante participação durante o processo de fertilização, sendo demonstrado que, *in vitro*, essas células têm uma função de selecionar e “atrair” quimicamente os espermatozoides (Chian *et. al.*, 1996), além de induzir a capacitação espermática e a reação acrossomal em bovinos (Fukui, 1990)

### 2.2.1 – Maturação nuclear

A maturação nuclear tem como característica a habilidade do oócito em retomar a meiose até o estágio de metáfase II, podendo ser observada pela extrusão do primeiro corpúsculo polar (Watson, 2007; Blanco *et. al.*, 2011). *In vivo*, o bloqueio meiótico no estágio de VG é mantido pelas altas concentrações do monofosfato cíclico de adenosina (AMP cíclico) produzido pelas células da granulosa e transportado para o oócito via junções Gap. Após a puberdade, uma onda de hormônio luteinizante (LH) causa o declínio do AMP cíclico, primeiro pelo desligamento das junções Gap entre oócito e células da granulosa e depois pela redução da sua produção pela granulosa (Kawamura *et.*

*al.*, 2004). O declínio do AMP cíclico provoca a desfosforilação e consequente ativação do MPF, esse fator é uma proteína quinase constituída por uma subunidade catalítica (p34), e outra regulatória, a ciclina B (Gautier e Maller, 1991), sendo que sua atividade aumenta no estágio de quebra da vesícula germinativa, com alta atividade em metáfase I, decrescendo em anáfase e telófase, alcançando outro pico em metáfase II que, por sua vez, está envolvido com a quebra do envelope nuclear (VGBD), condensação da cromatina, reorganização do citoesqueleto e bloqueio da atividade transcricional (Miller e Russell, 1992).

Durante o período de amadurecimento dos oócitos bovinos, ocorre um rearranjo espacial das organelas (maturação citoplasmática) ocorrendo uma reorganização do citoesqueleto, formando uma rede onde as organelas delimitadas por membranas se movimentam e assumem posições definidas (Albertini, 1992). Ao entrar na fase M do ciclo celular, após a GVBD, “ásters” de microtúbulos aparecem próximos à cromatina condensada (Figura 2), os microfilamentos distribuem-se na área cortical (Li *et. al.*, 2005). No estágio de metáfase I, formando o fuso meiótico (figura 2) e a placa metafásica. Ao atingir o estágio de anáfase I, os cromossomos começam a ser separados e o fuso se alonga e uma grande quantidade de microfilamentos passa a ser observado ao redor dos cromossomos e no estágio de telófase I (figura 2), os microtúbulos formam uma estrutura semelhante a um cone com uma extremidade larga e outra fina, e a porção mais larga de microtúbulos está ligada ao conjunto cromossômico destinado à extrusão do primeiro corpúsculo polar (Ferreira, 2008; Figura 2). A porção mais fina encontra-se associada ao conjunto que irá permanecer no oócito e entrar na meiose II.

Portanto, durante a meiose oocitária, esse sistema estrutural tem papel fundamental para garantir que quase todo o citoplasma da célula em divisão permaneça no oócito secundário, já que este acumulou toda a informação necessária para a progressão das etapas subsequentes, e eliminar apenas uma pequena porção citoplasmática (Li *et.al.*, 2005).

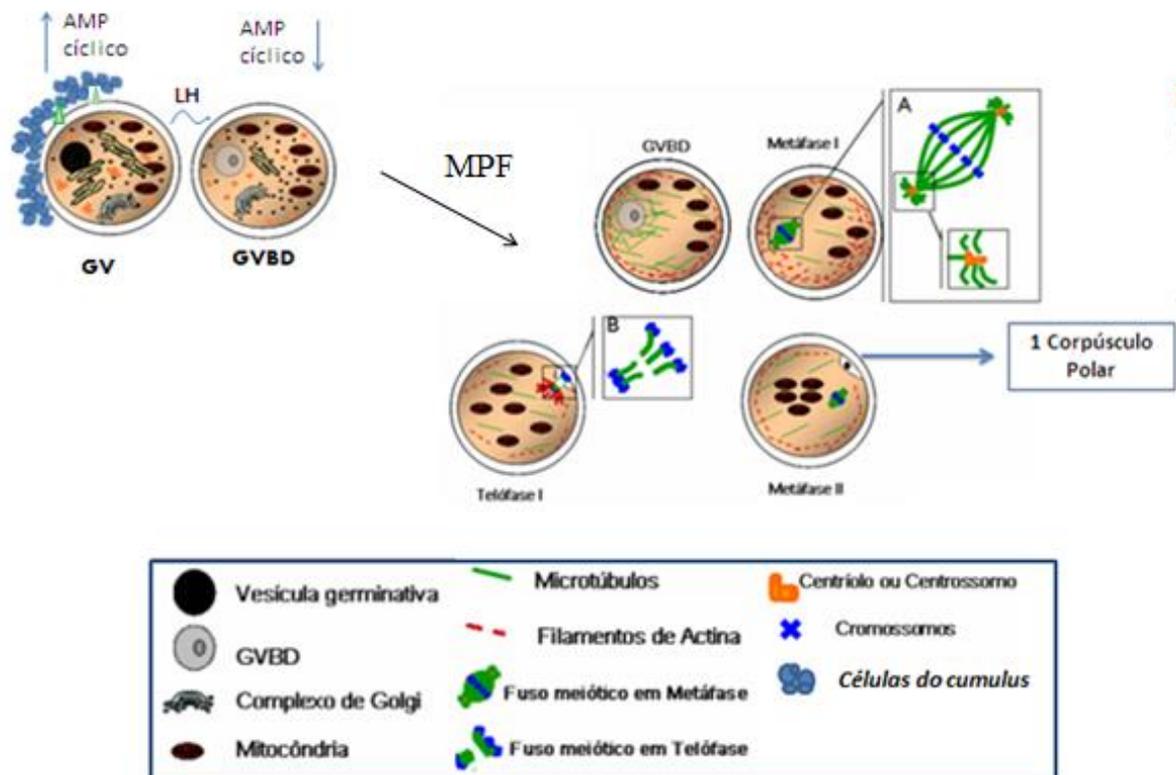


Figura 2: Oócito em estágio de VG rodeado pelas células da granulosa onde após uma onda de LH ocorre a redução do AMP e ativação do Fator Promotor de Maturação resultando na GVBD e acumulando ástes de microtúbulos ao redor da cromatina condensada. (A) Detalhe do fuso meiótico em metáfase I e a estrutura do centríolo/centrossomo. (B) Detalhe do fuso meiótico em telófase I, em que podemos ver os microtúbulos entre os conjuntos cromossômicos. (Fonte: modificado de Ferreira *et. al.*, 2008).

### 2.3. Ativação Partenogenética

A ionomicina é um ionóforo de cálcio que, promove a retomada da meiose. Porém, frequentemente, a formação dos pronúcleos e o desenvolvimento posterior são comprometidos por uma baixa estimulação (Susko-Parrisch *et. al.*, 1994). O aumento do número de estimulações com ionomicina em intervalos de 30 min promovem uma melhor

ativação dos oócitos (Rho *et. al.*, 1998a) e a combinação da ionomicina com a 6-dimetil-amino-purina (6-DMAP) promove altas taxas de ativação e clivagem (Rho *et. al.*, 1998b).

O 6-DMAP é um inibidor específico da proteína quinase, gerando um bloqueio na fosforilação proteica e desta forma inibe a atividade do MPF e do fator citosólico (CSF) (Machaty e Prather, 1998). Bons resultados de ativação de oócitos bovinos têm sido obtidos pela combinação de ionomicina com 6-DMAP, sendo os efeitos variáveis com o intervalo entre os tratamentos sequenciais com estas substâncias (Susko *et. al.*, 1994; Rho *et. al.*, 1998a).

#### 2.4 – Aperfeiçoamento da etapa de MIV

Osmolaridade, atmosfera, pH e nutrientes do meio são fatores que devem ser controlados durante a maturação *in vitro*, tentando sempre seguir as características mais próximas possíveis do ambiente folicular *in vivo*. Atualmente, as pesquisas realizadas com o objetivo de se aumentar a eficiência do desenvolvimento de oócitos cultivados *in vitro* têm recebido alguns enfoques, sendo o principal: a adição de substâncias promotoras de crescimento ao meio de maturação.

Tanaka (2008) desenvolveu o trabalho que teve como objetivo avaliar o efeito da melatonina adicionada ao meio de maturação TCM-199 sobre a maturação nuclear e sobre a taxa de formação de embriões e os resultados sugerem que a adição da melatonina durante a maturação dos oócitos protege as células da granulosa de danos processados pelos ERO's, e assim evitando a apoptose e foram capazes de suportar o desenvolvimento embrionário produzindo taxas de embrião similares as obtidas no sistema tradicional de PIVE.

Outra opção é a suplementação com fatores de crescimento como, por exemplo, fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs), o Kit ligante (KL), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), dentre vários outros com o objetivo de incrementar o meio de maturação, visando à melhora da produção *in vitro* de embriões (Gottardi, 2009). Por exemplo, a complementação do meio de maturação com VEGF alterou positivamente a fertilização e desenvolvimento embrionário bovino (Luo *et. al.*, 2002). Em outro estudo, Zhang *et. al.* (2010) observaram resultados positivos ao

adicionarem fator de crescimento fibroblástico -10 (FGF10) em meio de maturação para oócitos bovinos melhorando a expansão das células do cumulus, o número de oócitos maduros (extrusão do primeiro corpúsculo polar) e elevando as taxas de desenvolvimento embrionário. Caixeta (2012) demonstrou expansão das células do *cumulus* por adição de FGF10 ao meio de maturação na espécie bovina.

Sampaio *et. al.* (2012) trabalharam com o uso da melatonina na maturação *in vitro*, onde buscou-se investigando a presença de receptores de melatonina na membrana (MT1 and MT2) e local de ligação MT3 em oócitos e avaliar seus efeitos sobre a PIVE, concluindo que as taxas de clivagem e blastocistos aumentaram, sugerindo que esse hormônio não só tem ação captador de radicais livres, mas também tem efeitos sobre a maturação do oócito por varias vias de mecanismos, incluindo a ativação do receptor de membrana. Guemra *et. al.* (2013) relataram o uso do flavonoide de atividade antioxidante chamado quercetina na maturação *in vitro* de embriões bovinos, obtendo taxas de formação blastocistos superiores aos obtidos com o meio usual Tissue Culture Media (TCM-199). Costa *et. al.* 2015 avaliaram o efeito da inclusão de cortisol ao meio de maturação de oócitos bovinos, chegando à conclusão que houve melhora na maturação oocitária quando o meio de MIV foi suplementado com 0,1 mg / mL aumentando as taxas de blastocisto em comparação com os controles não tratados com cortisol.

## 2.5 Células tronco

As células tronco são um grupo de células presentes em menor quantidade no nosso corpo, com capacidade de auto renovação, diferenciação em diversos tipos celulares e reconstituição funcional de determinados tecidos (Souza, 2010), podendo ser classificadas como: totipotentes, pluripotenes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes (Figura 3).

As totipotentes são capazes de originar um organismo completo, uma vez que têm a capacidade de gerar todos os tipos de células e tecidos do corpo, incluindo tecidos embrionários e extraembrionários. As pluripotentes são obtidas a partir da massa celular interna de blastocistos, dotadas de grande plasticidade e apresentam uma ilimitada capacidade de proliferação *in vitro*, além da possibilidade de formar células derivadas dos

três folhetos embrionários em cultura (Amorim, 2012). As multipotentes que têm a capacidade de gerar um número limitado de células especializado podendo ser encontradas em quase todas as áreas do corpo (LCTE, 2012; Souza et.al., 2010). CT oligopotentes são capazes de diferenciar-se em poucos tecidos e são encontradas em diversos tecidos já diferenciados. CT unipotentes são células que conseguem apenas se diferenciar em um único tecido, ou seja, o tecido a que pertencem (Soares, 2012).

A categoria de CT adultas pode ser divididas em hematopoiética (CTHe) e mesenquimais (MSC). As CTHe são células que além de possuírem a capacidade de se autor-renovar, podem se diferenciar em células especializadas do tecido sanguíneo e células do sistema imune (Amorim, 2012). A sua obtenção é feita a partir da medula óssea, do cordão umbilical ou do sangue periférico (Junior, 2009).

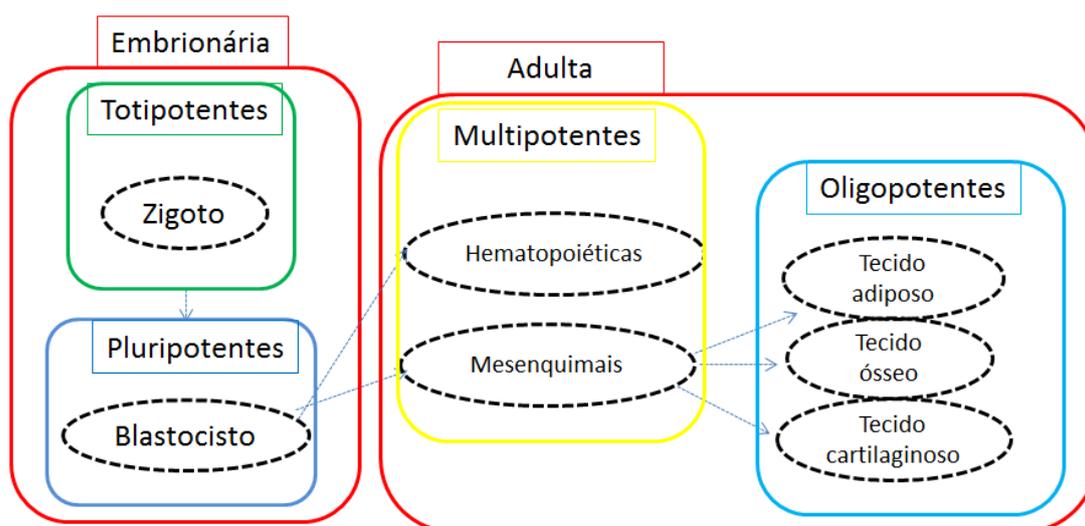


Figura 3: Esquema representando a origem de CT embrionária e adulta, a potência: Totipotente encontrada apenas no zigoto, pluripotentes encontrada na massa interna do blastocisto, multipotentes encontradas em diversas partes do corpo do indivíduo adulto podendo ser CTHe ou MSC, sendo a mesenquimal diferenciada em tecidos adiposo, ósseo e cartilagenoso.

As células tronco mesenquimais (MSC) são consideradas células multipotentes com propriedades de autorrenovação e capacidade de diferenciação em tecidos mesenquimais e, possivelmente, em não mesenquimais (Amorim, 2012). As MSC são

consideradas uma linhagem de células-tronco somáticas e estão presentes em regiões perivasculares de todos os tecidos adultos, em pequenas quantidades, incluindo a medula óssea, o tecido adiposo, o tecido muscular e os órgãos parenquimatosos (Meirelles *et al.*, 2008; Mambelli *et al.*, 2009; Zucconi *et al.*, 2009) .

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) propôs três critérios básicos para que se possa definir uma célula como sendo MSC. Assim, as células-tronco mesenquimais devem ser: (1) plásticas-aderentes caso mantidas em condições básicas de cultura; (2) positivas para determinados marcadores moleculares CD105, CD73 e CD90 e negativas para CD45, CD34, CD14 e CD11b; e (3) capazes de se diferenciar em fibroblastos, osteoblastos, adipócitos e condroblastos quando expostas *in vitro* às linhagens correspondentes (Dominici, 2006; Sousa, *et al.*, 2010). As MSC's expressam um grande número de moléculas bioativas como as moléculas de adesão, as proteínas de matriz extracelular, as citocinas e os receptores para fatores de crescimento, permitindo interações com demais células (Huss, 2000; Bobis *et al.*, 2006), bem como podem secretar fatores que reforçam a diferenciação das células e são produzidos por mecanismos parácrinos (Wu, 2012).

#### 2.5.1 Células tronco mesenquimais derivadas do tecido Adiposo (MSC-Ad)

As células-tronco adultas derivadas do estroma do tecido adiposo (MSC-ad), apresentam como vantagem o método fácil de obtenção da fonte tecidual (Yarak *et al.*, 2010), pois o tecido é altamente complexo, composto por adipócitos maduros, pré-adipócitos, fibroblastos, células musculares lisas vasculares, células endoteliais, monócitos e macrófagos residentes e linfócitos (Fonseca, 2014), o que permite o fácil isolamento e permitir a extração de um grande volume de tecido de baixa morbidade. Baseado nisso, o tecido adiposo pode apresentar uma fonte rica de células tronco de origem adulta gerando oportunidade de pesquisa em diversos campos da medicina regenerativa e terapia celular.

Além de adipócitos, ele é constituído de uma matriz de tecido conjuntivo (fibras colágenas e reticulares), tecido nervoso, células do estroma vascular, células imune, fibroblastos e células tronco (Osbourne, 2000; Fruhbeck *et al.*, 2001, Oliveira, 2012) (Figura 3). Observou-se, nos últimos anos, que o tecido adiposo não é apenas um

provedor e armazenador de energia, mas um órgão dinâmico, produtor de hormônios, que está envolvido em uma variedade de processos fisiológicos e fisiopatológicos, por ser capaz de secretar várias proteínas denominadas adipocinas (Fruhbeck, 2001), com mecanismo autócrino, parácrino e endócrino que trabalham em microambiente para manter as funções normais do corpo.

Recentemente, a atenção tem sido dada às proteínas ativas secretadas por tecido adiposo, que são capazes de induzir CT adultas para se diferenciar em adipócitos (Stillaert *et.al.* 2007). Isto implica que o próprio tecido adiposo pode ser usado para aumentar a diferenciação das células estromais adulto através da produção de fatores intrínsecos de suporte. Assim, o tecido adiposo pode servir como uma camada alimentadora para si próprio ou suas próprias células-tronco (Suggi, 2010).

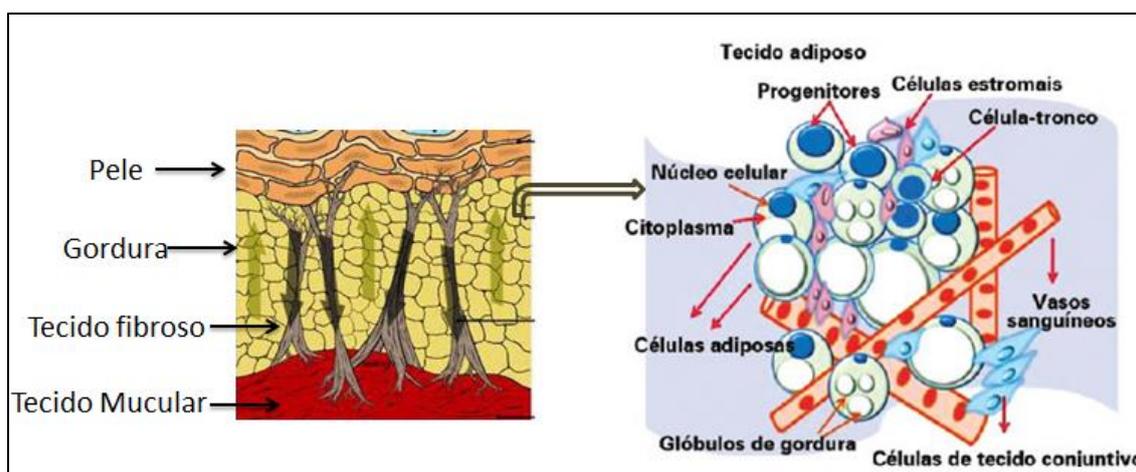


Figura 4: O tecido adiposo se localiza abaixo da camada de pele e entre e tecido muscular e o nicho das MSC's está localizada na região perivascular, sendo composto pelos vasos sanguíneos em associação com células de tecido conjuntivo, adiposas, estromais e diversos progenitores (Modificado de Irina Kerkris, 2013 e MD Saúde, 2015).

Uma vez que MSC's foram encontradas no tecido adiposo, viu-se a necessidade de investir em pesquisas para entender a relação de liberação de fatores parácrinos através de microvesículas para o meio celular a qual elas fazem parte, como por exemplo o meio de cultivo *in vitro*.

Evidências convincentes indicam que, além das suas capacidades multipotentes, as MSC's podem modular as respostas imunes inatas e adaptativas e a sua utilização terapêutica em várias doenças imunologicamente relacionados têm sido promissores (Tetta, 2011; Kilpinen, 2013). As MSC's mediam os seus efeitos clínicos de uma forma parácrina (Lee, 2009; Zannot, 2013), através da secreção de biomoléculas em forma de microvesículas que podem ser transmitido por diferentes categorias de outras biomoléculas, desencadeando efeitos diferentes dependendo da célula alvo (Lai, 2010, Yanez-Mo *et. al.*, 2015) (figura: 05). Além disso, as MSC-ad secretam uma grande variedade quimiocinas (citocinas, fatores de crescimento, e mesmo microRNAs). A evidência crescente apoia a noção de que o mecanismo de benefício funcional após a implantação MSC é predominantemente dependente de efeitos parácrinos (Ozaki, 2007; Meirelles, 2009). Estudo funcional demonstra que células tronco derivadas de tecido adiposo humano pode ter efeitos imunomoduladores e têm vantagens biológicas na capacidade proliferativa, as proteínas segregadas (bFGF, IFN- $\gamma$ , e o IGF-1) (Chung-yu, *et. al.*, 2015).

Tem sido referido que o EGF e IGF-I melhoram a taxa de progressão meiótica dos oócitos de bovino com células do cumulus (Sakaguchi, 2000(a), Sakaguchi, 2004 (b)). Chun-yu, *et. al.*, 2015, analisaram e compararam a expressão de fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas em meio condicionado com células tronco mesenquimais da medula óssea e de MSC derivadas de tecido adiposo humano e encontraram fatores de celulares apropriadas para a terapia celular, sendo estas bFGF, IGF-1, e VEGF. Dessa forma, as MSC-ad interagem com as células residentes e podem induzi-las, por mecanismo parácrino, a se diferenciar em linhagens celulares distintas, de acordo com essa sinalização (Takahashi *et al.*, 2007) modulando o microambiente a sua volta (Baglio *et. al.*, 2012).

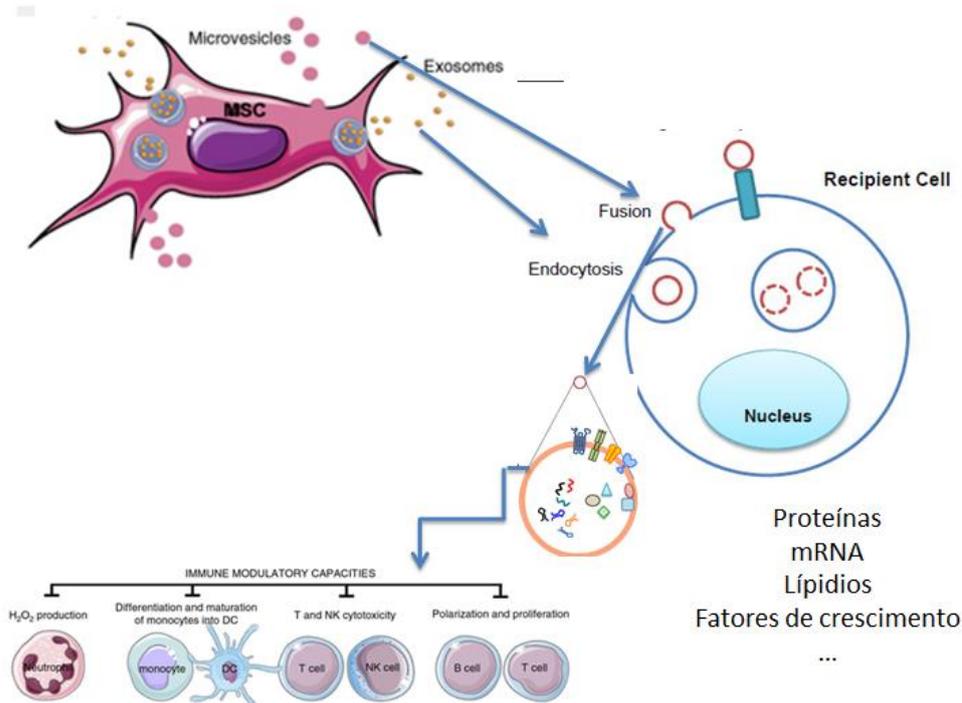


Figura 5: Esquema de modulação parácrina da MSC-ad, ao secretar microvesículas contendo biomoléculas para o meio externo para que atinja a célula alvo de forma a modular um microambiente. (Fonte: Modificada de Yoon, 2014; Yanez-Mo, *et. al.*, 2015).

## 2.6 Uso de CT na PIVE

Para assegurar bons resultados na PIVE é necessário que se forneça condições semelhantes ao encontrado nos ovários e ducto ovariano das fêmeas, sendo necessário, investir em um microambiente que envolve temperatura, pH, e tempo de realização cada etapa o mais próximos ao ambiente *in vivo*. E obedecer aos padrões de qualidade oocitária e principalmente os nutrientes presentes nos meios na MIV, FIV e CIV de forma a garantir sucesso no processo de PIVE.

Diversos estudos foram desenvolvidos nos últimos anos com o intuito de provocar a melhoria no protocolo usual de PIVE, uma vez que não conseguimos taxa de produção iguais ou superiores ao processo *in vivo*. Sabendo dos benefícios que o cultivo de células tronco vem apresentando para pesquisas que envolvem a medicina regenerativa e terapia

celular, com a modulação do micromebiente através da secreção de moléculas bioativas, viu-se a oportunidade de unir as duas técnicas para pesquisas com nas biotécnicas reprodutivas, seja com a utilização das células tronco ou o meio condicionado nas etapas de maturação e cultivo. Ling *et. al.* (2008) foram os primeiro a explorar a utilização de CT na PIVE, ao utilizarem meio condicionado por células tronco mesenquimais da medula óssea (CTMMO) de camundongos na maturação *in vitro*, relatando melhora na taxa de maturação dos oócitos indicando que o meio condicionado com células mesenquimais provou ser mais efetivo para o crescimento folicular, maturação oocitária e consequente desenvolvimento embrionário em camundongos.

Estudos feitos por Kim *et. al.* (2011) e Park *et. al.* (2013) mostraram, em bovinos e suínos, que a suplementação do meio de cultivo, com meio condicionado por MSC melhorou a quantidade e a qualidade dos embriões obtidos por PIVE. Similarmente, Moshkdanian *et. al.* (2011) relataram que a utilização de células tronco, derivadas do cordão umbilical humano no co-cultivo com embriões de ratos atenuaram os efeitos adversos induzidos pela exposição à luz.

Finalmente Nascimento *et. al.* (2014), dados não publicados, utilizaram células tronco mesenquimais obtidas de bovinos adultos (MSC-adb) no co-cultivo de embriões bovinos produzidos *in vitro* e relataram melhores resultados na quantidade e qualidade dos embriões quando comparado ao co-cultivo tradicional dos embriões utilizando a monocamada de células da granulosa.

### **3. HIPÓTESE**

É possível obter desenvolvimento embrionária *in vitro* provenientes de oócitos maturados em meio de MIV condicionado por MSC de origem bovina, na etapa MIV, e ativados partenogeneticamente, e se, a taxa de produção embrionária são superiores ao meio convencional.

### **4. OBJETIVOS**

## 4.1 Objetivo Geral

-Aprimorar a etapa de maturação no protocolo de produção *in vitro* de embriões bovinos.

## 4.2- Objetivos específicos

-Condicionar o meio de MIV com as MSC-adb.

-Avaliar a maturação nuclear oocitária em meio de MIV condicionado com MSC-adb.

-Avaliar a clivagem e o desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos partenogênicos derivados de oócitos bovinos maturados em meio condicionado com MSC-adb.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O experimento foi realizado em duas etapas (Figura 06): primeira foi compreendida pelo isolamento, cultivo, caracterização de MSC-adb e condicionamento do meio de MIV. Para isso as MSC-adb foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, GIBCO) por três passagens (P3) para realização do condicionamento do meio MIV por 24, 48 e 72 horas. E cultivadas por quatro passagens (P4) para realização da curva de crescimento e diferenciação nas linhagens osteogênica, condrogênica e adipogênica.

Na segunda etapa o meio de MIV condicionado foi utilizado no processo de maturação *in vitro* de oócitos bovinos, sendo feita a avaliação do desenvolvimento embrionário até a eclosão de blastocisto (oitavo dia de cultivo), nos três grupos condicionados mais o grupo controle (meio de MIV usual) perfazendo quatro grupos experimentais:

- Grupo COND-24: PIVE realizada utilizando-se o meio de MIV condicionado por células tronco durante 24 horas e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Grupo COND-48: PIVE realizada utilizando-se o meio de MIV condicionado por células tronco durante 48 horas e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Grupo COND-72: PIVE realizada utilizando-se o meio de MIV condicionado por células tronco durante 72 horas e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
- Grupo CONTROLE: PIVE realizada utilizando-se o meio de MIV aerado em estufa por 24 horas e congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Após a maturação de 24 horas, os oócitos foram destinados à avaliação da extrusão do primeiro corpúsculo polar, seguidos de ativação por partenogênese e cultivados sem monocamada, onde o desenvolvimento embrionário foi avaliado quanto às taxas de clivagem no 2º dia após a ativação (D2) e a quantidade e de embriões formados (D7) e eclodidos (D8).

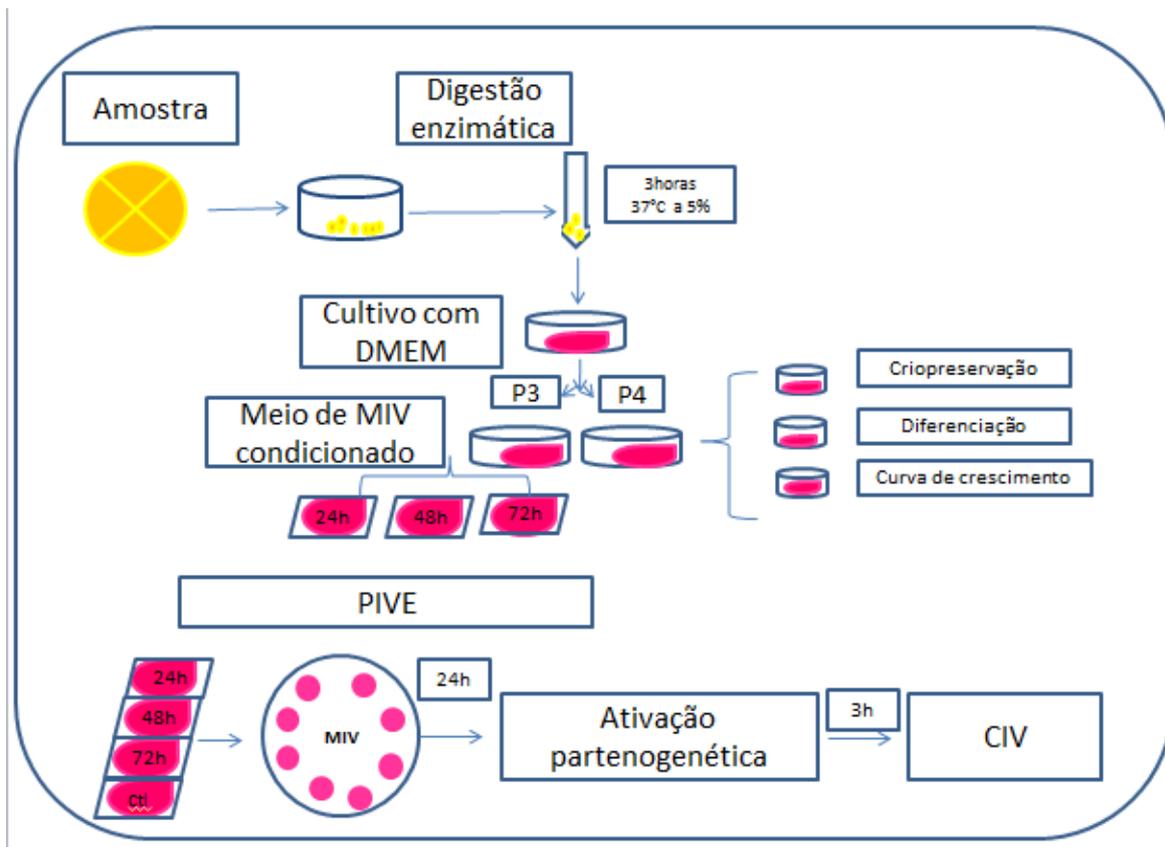


Figura 6: Descrição geral do experimento, detalhando a etapa de cultivo de células tronco mesenquimais a partir do tecido adiposo. Na passagem P4 foi feita a Criopreservação das células, Curva de crescimento, diferenciação e na passagem P3 foi realizado o condicionamento do meio de MIV em 24, 48 e 72 horas. A etapa de PIVE composta pela utilização dos meios condicionados na fase de Maturação para posterior ativação partenogenética e CIV.

## 5.2- Isolamentos e caracterização das CT

O tecido adiposo foi coletado no Frigorífico Industrial de Castanhal LTDA-CASFRISA, localizada no município de Castanhal/Inhangapi sn, km 7, área rural. A amostra foi retirada da gordura torácica de bovino (*Bos taurus*) macho adulto com o auxílio de materiais cirúrgico estéril e lavados no local com solução salina a 37°C por duas vezes, e acondicionados em tubos plásticos estéreis contendo 50 ml de PBS (Phosphate

Buffered Saline- Tampão fosfato salino) suplementado com 50 µl de gentamicina (SIGMA-ALDRICH) e transportado em caixa térmica ao laboratório de cultivo de células tronco/UFPA/Castanhal (LabTronVet) onde permaneceu por 24 horas em solução de PBS suplementado com 400 unidades/mL de penicilina (GIBCO) e 400 µl/mL estreptomicina (GIBCO).

Após as primeiras 24 horas a amostra foi novamente lavada em PBS suplementado com gentamicina, posteriormente e o tecido adiposo foi triturado com auxílio de lâmina (SOLIDOR n°24) com bisturi sobre placa de petri de vidro esterilizada até a obtenção uma massa homogênea. Com esta massa foi feita a digestão enzimática com 1mg/mL de Colagenase tipo I (SIGMA-ALDRICH) (diluída em PBS) e incubada pelo período de 3 horas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após este período a ação da colagenase foi neutralizada com 1ml de meio de cultivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, SIGMA) e 50µl/ml gentamicina.

O tecido digerido foi centrifugado por 5 minutos a 300 X g. O sobrenadante descartado e o *pellet* centrifugado novamente sobre as mesmas condições e ressuspendido em 1 ml de meio de cultivo DMEM+10% SFB suplementado com antibiótico e cultivado em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C .

As células foram cultivadas em placas de petri de poliestireno estéreis (Corning) de 35 mm de diâmetro, com trocas regulares do meio de cultivo DMEM + 10% SFB a cada 24 horas até atingirem a semi-confluência de 70%, quando então foram repicadas com tripsina 0,25% (Tryple Express, GIBCO) para garrafas de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> (SARDESTS) e cultivadas sob as mesmas condições. A renovação do meio de cultivo prevaleceu a cada três dias até a visualização da semi-confluência quando novamente foram repicadas para as passagens desejadas ao trabalho em questão. A criopreservação das células, cultivadas foram ressuspendidas em meio composto por 1ml de DMEM suplementado com 20% de SFB, 50µl de gentamicina, 10% de DMSO (Dimethyl Sulfoxide – Hibry Max, Sigma) e envasadas em palhetas de 250 µl (10<sup>6</sup> células/ml) mantidas a 4°C por 1 hora , a -20°C por mais 1 hora, ao vapor de nitrogênio líquido por mais 1 hora e imersas em nitrogênio líquido para posteriores trabalhos. As CT criopreservadas foram descongeladas em banho maria sempre que necessário.

Na passagem P4, as MSC-*adb* foram analisadas quanto à curva de crescimento e a diferenciação *in vitro* nos três tipos de tecidos pré-estabelecidos.

### 5.2.1 Diferenciação

Para diferenciação em adipócitos, as células foram cultivadas até a quarta passagem (p4) em placas de 24 poços com meio DMEM + 10% FSB por três dias em uma densidade de  $1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>, tendo a substituição do meio de cultivo no quarto dia pelo kit de indução a diferenciação adipogênica (STEMPRO, GIBCO) e permanecendo em cultivo por 21 dias, com trocas regulares de meio a cada três dias. Após os 21 dias as células foram fixadas com paraformaldeído 4% por 1 hora, lavadas com PBS e coradas com Oil Red por 5 minutos para visualização do acúmulo intracelular de gotas lipídicas.

A diferenciação em condrogênica, as células foram cultivadas em meio DMEM até a quarta passagem por três dias em placa de 24 poços em uma densidade de  $0,25 \times 10^7$  células/cm<sup>2</sup> como uma micromassa durante duas horas e posteriormente adicionado o kit de indução diferenciação (Stempro, Gibco) e cultivadas por 21 dias com trocas regulares de meio a cada 3 dias. A diferenciação foi confirmada após a lavagem duas vezes com PBS fixação com paraformaldeído 4% por 20 minutos e coradas com Alcian Blue 1% por 5 minutos para visualização de glicosaminoglicanos.

Para a diferenciação em células osteogênicas, as células foram cultivadas em meio DMEM por três dias na quarta passagem em placa de 24 poços em uma densidade de  $5 \times 10^3$  células/cm<sup>2</sup> por três dias e posteriormente substituído pelo kit de indução a diferenciação osteogênico (STEMPRO, GIBCO), sendo cultivada por 21 dias com trocas regulares de meio a cada três dias. Após esse período as células foram lavadas com PBS por duas vezes e fixadas com paraformaldeído 4% por 20 minutos temperatura ambiente, coradas com Alizarin Red S 2% por 5 minutos para visualização do depósito de Cálcio.

Os controles negativos para cada grupo a ser diferenciado cultivado com meio DMEM por 21 dias corridos, obedecendo às mesmas condições de cultivo das células a serem diferenciadas.

### 5.3 Curva de crescimento

A curva de crescimento foi avaliada na quarta passagem (P4), onde as células foram plaqueadas em placa de cultivo de 24 poços (TPP) com meio de cultivo DMEM + 10% de SFB por 12 dias, tendo renovação de meio de cultivo a cada 48 horas, bem como a contagem e estimativa da quantidade de células de cada poço através da câmara de Neubauer.

### 5.4 Condicionamento do meio MIV com células tronco MSC's-ad

Condicionamento do meio de MIV com as MSCs-Ad bovinas foi realizado como descrito por Da Silveira *et. al.* (2012). As células foram cultivadas até a passagem três (P3) com meio DMEM + 10% SFB até atingirem a semi-confluência de 70% quando então este meio de cultivo foi retirado e substituído pelo meio de MIV e incubadas por 24, 48 e 72 horas em estufa com atmosfera gasosa de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 37 graus. Ao final do condicionamento, o meio sobrenadante foi coletado, filtrado (0,22 um), aliquotado e então congelado imediatamente em freezer -20°C. Estas alíquotas foram descongeladas ao longo do experimento de PIVE conforme a necessidade. O meio de MIV trabalhado é consistindo de TCM 199 com sais de Earles, suplementado com 10% de soro fetal bovino, piruvato e gentamicina. Sendo suplementando com 5 µg/ml de gonadotrofina coriônica do soro de égua gestante (PMSG, NOVORMON), 5 µg/ml de gonadotrofina coriônica humana (HCG, NOVORMON), no momento de confecção da placa de MIV.

### 5.5 Obtenção dos ovários e seleção de oócitos para PIVE

Os ovários foram obtidos do abatedouro SOCIPE logo após o abate das fêmeas, lavados no local com solução fisiológica a 0,9% de NaCl a 30-33°C e transportados ao laboratório de Fertilização *in vitro* da UFPA/Belém. Os folículos foram imediatamente aspirados com auxílio de agulhas 18G e seringas descartáveis, depositados em tubos estéreis (SARDEST) de 15 ml, permanecendo em repouso por alguns minutos para sedimentação das células no fundo dos tubos (*pellet*). Após esse período o sobrenadante foi descartado e o *pellet* misturado à solução de TALP lavagem e imediatamente direcionados

para o rastreio em placas de petri estéreis e descartáveis de 60 mm para posterior seleção. Foram selecionados os *complexo cumulus oócito* (CCO's) que apresentavam o mínimo de duas camadas de células do cumulus e citoplasma heterogêneo, uma vez que a punção dos ovários resultava numa quantidade reduzida de oócitos com boa qualidade morfológica.

#### 5.5.1 Maturação *in vitro* - MIV

Após a seleção os CCO's foram lavados primeiramente em meio de maturação fresco TCM-199 suplementados 10% de SFB, piruvato (SIGMA) e gentamicina, posteriormente lavados por três vezes em micro-gotas de meio de maturação condicionado em seus respectivos grupos e incubados em entre 10 a 15 oócitos qualidade 1 e 2 por gotas de 100 µl de meio de MIV condicionado ou não MSC-adb suplementado no momento da confecção da placa de MIV com 0,5 µl de PMSG e 0,5 µl de HCG, sob óleo mineral por 24 horas em estufa a atmosfera gasosa de 5% de CO<sub>2</sub> e 38,5°C.

#### 5.5.2 Ativação Partenogenética

A ativação partenogenética foi feita de acordo com Miranda *et. al.* (2009). Após as 24 horas de MIV, os oócitos foram desnudados mecanicamente através de sucessivas pipetagens em 0,5 µg/mL de hialuronidase (SIGMA-ALDRICH) para remoção das células do *cumulus*. Os oócitos desnudos foram submetidos à ativação partenogenética. A ativação foi iniciada em meio TCM 199 contendo 5 µM de ionomicina (Sigma-Aldrich) e 1 mg/mL de BSA, por um período de 5 minutos por grupo, após esse período os oócitos foram lavados e então incubados por 3 horas em micro-gotas de 100µl de 6-DMAP (SOF - Synthetic Oviductal Fluid - suplementado com 2 mM de 6-DMAP, SIGMA). Terminado o período de incubação, os oócitos prosseguiram para o cultivo embrionário.

#### 5.5.3 Cultivo *in vitro*

Após 24 horas de ativação partenogenética embriões foram transferidos para micro-gotas de 100µl de meio de cultivo Synthetic Oviductal Fluid (SOF) suplementado com 10% de SFB, 6mg/ml de BSA e 50 µg/mL de gentamicina, onde permaneceu por oito dias em estufa a 38,5°C de CO<sub>2</sub>. Os embriões partenogenéticos foram analisados após 48 horas

de ativação para contagem da clivagem, no sétimo dia para contagem de blastocisto e no oitavo dia para avaliação eclosão de blastocisto.

## 5.6 Análise Estatística

As médias e porcentagens utilizadas no trabalho foram calculadas nos softwares Microsoft Excel 2010 e SigmaPlot 11.0. Foi realizado o teste ANOVA e pós-teste de Fisher para os resultados obtidos de maturação nuclear, formação e eclosão de blastocisto. Em todos os testes foi adotado nível de significância de 5%.

## 6. RESULTADOS

6.1 Apresentam-se, a seguir, os resultados obtidos para cada etapa do processo para a produção do meio de MIV condicionamento.

### 6.1.1 Isolamento e caracterização morfológica das MSC-ad de bovino.

As células MSC-adb foram cultivadas e plaqueadas nas passagens P3 e P4. As células apresentaram aderência à superfície de cultivo (plástico), morfologia achatada e uniforme semelhantes a fibroblastos, essas características se mantiveram ao longo das passagens (Figura 7).



Figura 7: Cultivo de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo bovino (*Bos taurus indicus*), na passagem P3, aderidas ao fundo da placa apresentando morfologia similar a fibroblastos. Aumento de 400 X.

#### 6.1.2 Curva de crescimento celular

A avaliação do crescimento de células tronco MSC-ad foi evidenciado através da curva de crescimento na passagem P4. As quantificações foram realizadas em seis momentos em um total de doze dias. Na 1<sup>o</sup> avaliação, que ocorreu no 2<sup>o</sup> dia de cultivo foram quantificadas  $3,1 \times 10^4$  células. Na 2<sup>o</sup> avaliação, que ocorreu no 4<sup>o</sup> dia de cultivo, foram quantificadas  $6,2 \times 10^4$  células. E nas avaliações subsequentes que ocorreram no 6<sup>o</sup>, 8<sup>o</sup>, 10<sup>o</sup> e 12<sup>o</sup> dias foram quantificadas  $7,2 \times 10^4$ ,  $6,2 \times 10^4$ ,  $6,2 \times 10^4$  e  $6,1 \times 10^4$ , respectivamente (figura 8). A figura 9 mostra a avaliação visual da morfologia do crescimento celular durante as seis avaliações,

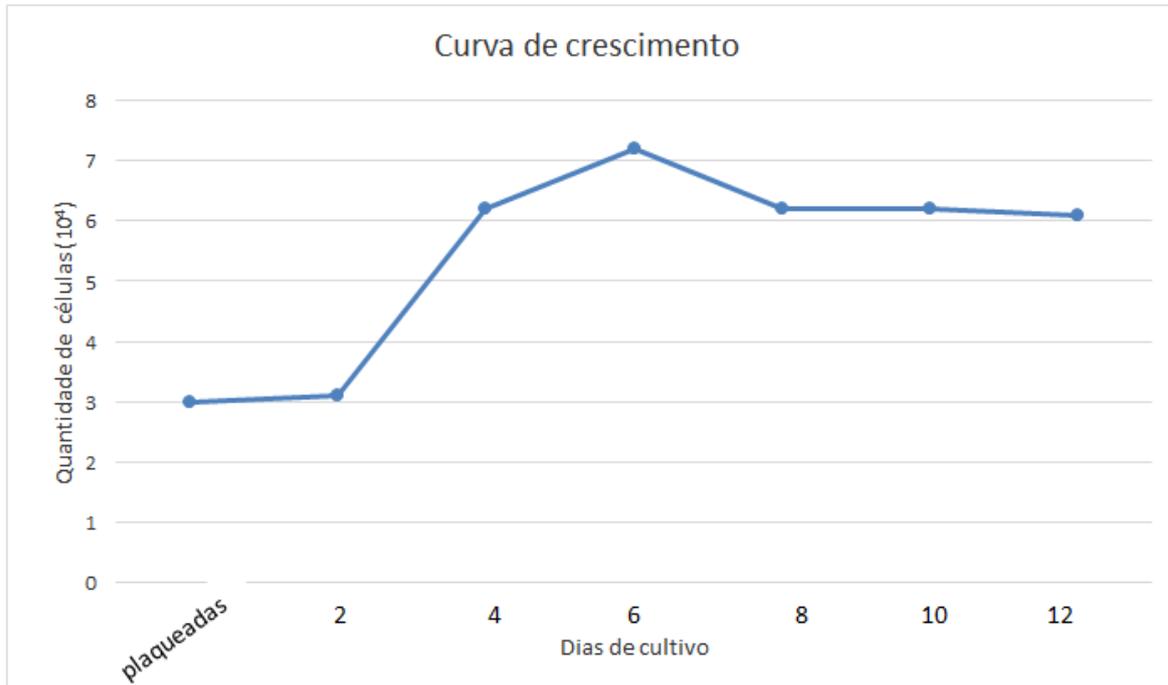


Figura 8: Curva de crescimento de células tronco MSC-adb na passagem P4. O gráfico ilustra o número de células quantificadas no eixo y e em função do número de avaliações no eixo x.

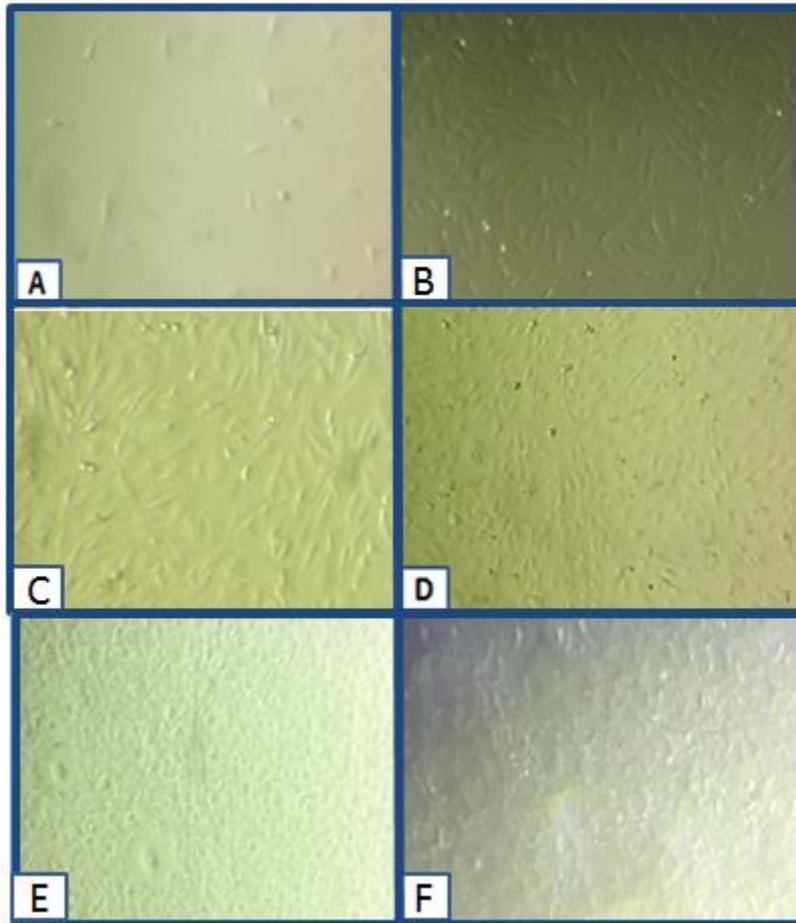


Figura 9. Avaliação visual da morfologia do crescimento de células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo bovino em seis avaliações. 1º avaliação com dois dias de cultivo (A), 2º avaliação com quatro dias de cultivo (B), 3º avaliação com seis dias de cultivo (C), 4º avaliação com oito dias de cultivo (D), 5º avaliação com dez dias de cultivo (E) e 6º avaliação com doze dias de cultivo (F). Aumento de 400 X.

### 6.1.3 Diferenciação das MSC-adb

Para confirmar a multipotência, MSC-adb foram submetidas ao processo de indução a diferenciação em três linhagens celulares *in vitro* pelo período de 21 dias de cultivo.

As MSC-adb cultivadas com meio de indução adipogênica coraram com o corante Oil Red evidenciando a existência de gotas intracelulares de lipídios, característico de

adipócitos (Figura 10-A). MSC-ad cultivadas com meio de indução condrogênica coraram com o corante Alcian Blue, evidenciando na matriz extracelular a produção de glicosaminoglicanos, característico de condrócitos (figura 9-B). As MSC-ad cultivadas com meio de indução osteogênico reagiu com o corante Alizarin Red, evidenciando mineralização da matriz extracelular corando os depósitos de cálcio, característico de osteócitos (figura 9-C). Foi confirmada assim a multipotência das MSC-ad isoladas neste estudo.

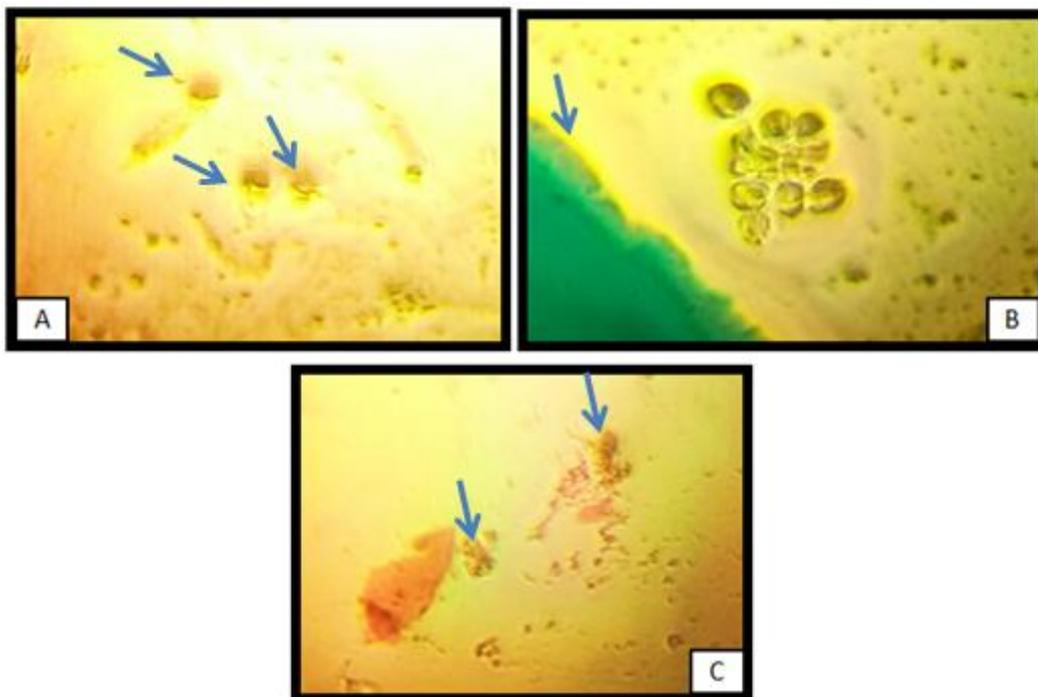


Figura 10: As MSC-ad foram cultivadas e diferenciadas na P4 em três linhagens celulares, no total foram 21 dias de indução. MSC-adb apresentando gotas lipídicas coradas com Oil Red, sugestivo de diferenciação em células do tecido adiposo (A). MSC-adb apresentando matriz extracelular com glicosaminoglicanos coradas com Alcian Blue, sugestivo de diferenciação para células do tecido cartilaginoso (B). MSC-adb apresentando depósitos de cálcio corados com Alizarin Red, sugestivo de diferenciação para células do tecido ósseo (C). Aumento de 400 X.

#### 6.1.4 Condicionamento das MSC-adb em meio de MIV.

Observamos pela morfologia que o potencial proliferativo das MSC-ad se manteve (Figura 11-A, B, C e D) atingindo a confluência nas primeiras 24 horas do início do condicionamento.

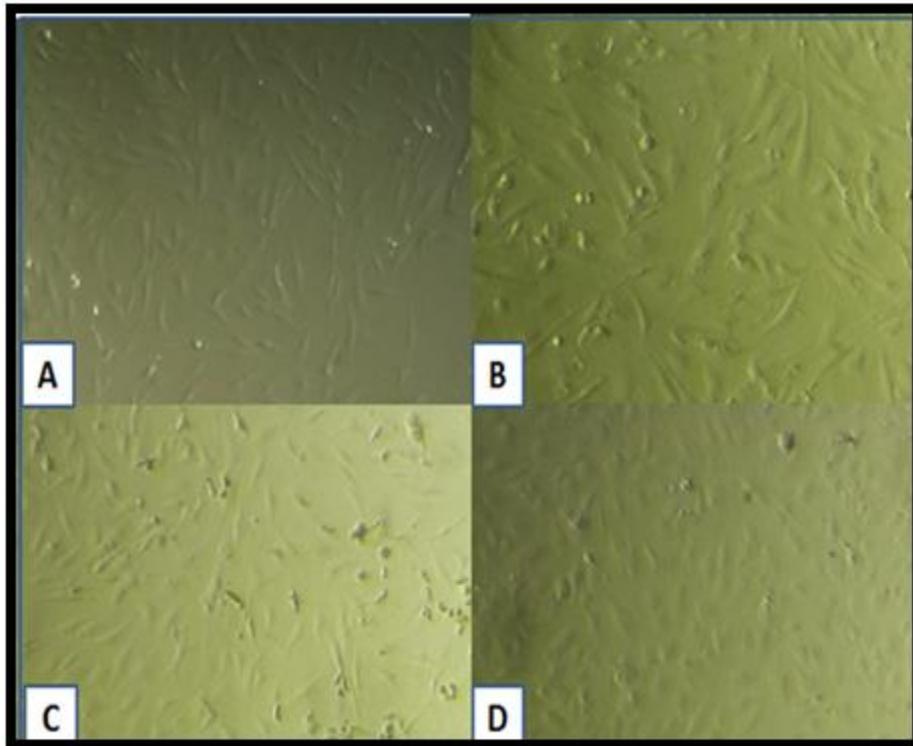


Figura 11 – Morfologia do crescimento celular- MSC-adb cultivadas somente em meio DMEM, grupo controle (A) e células cultivadas por 24 horas em meio de MIV (B), 48 horas (C) e 72 horas (D) Aumento de 400X. observamos que a troca de meio de cultivo não alterou o crescimento das células MSC-adb.

6.2 A seguir são apresentados os resultados do processo de produção *in vitro* de embriões bovinos partenogênicos.

##### 6.2.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos

Foram feitas cinco repetições para avaliação da maturação nuclear, mantendo sempre o mesmo padrão de qualidade oócitaria entre os grupos experimentais.

Após 24 horas de maturação observamos que o padrão de expansão das células da cumulus e a heterogeneidade do citoplasma se mantiveram iguais entre os grupos experimentais. Quanto à maturação nuclear, avaliamos os oócitos desnudos quanto a extrusão do 1º corpúsculo polar (Figura 12) e quantificamos os grupos CONTROLE, COND-24h, COND-48hs e COND-72, obtendo as seguintes médias 83,7%; 77,7%; 81,4%; 76,1% respectivamente (Tabela 1). Os resultados apresentados pelos grupos maturados em meio condicionados sofram similares ao grupo controle, não havendo diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre os grupos experimentais.

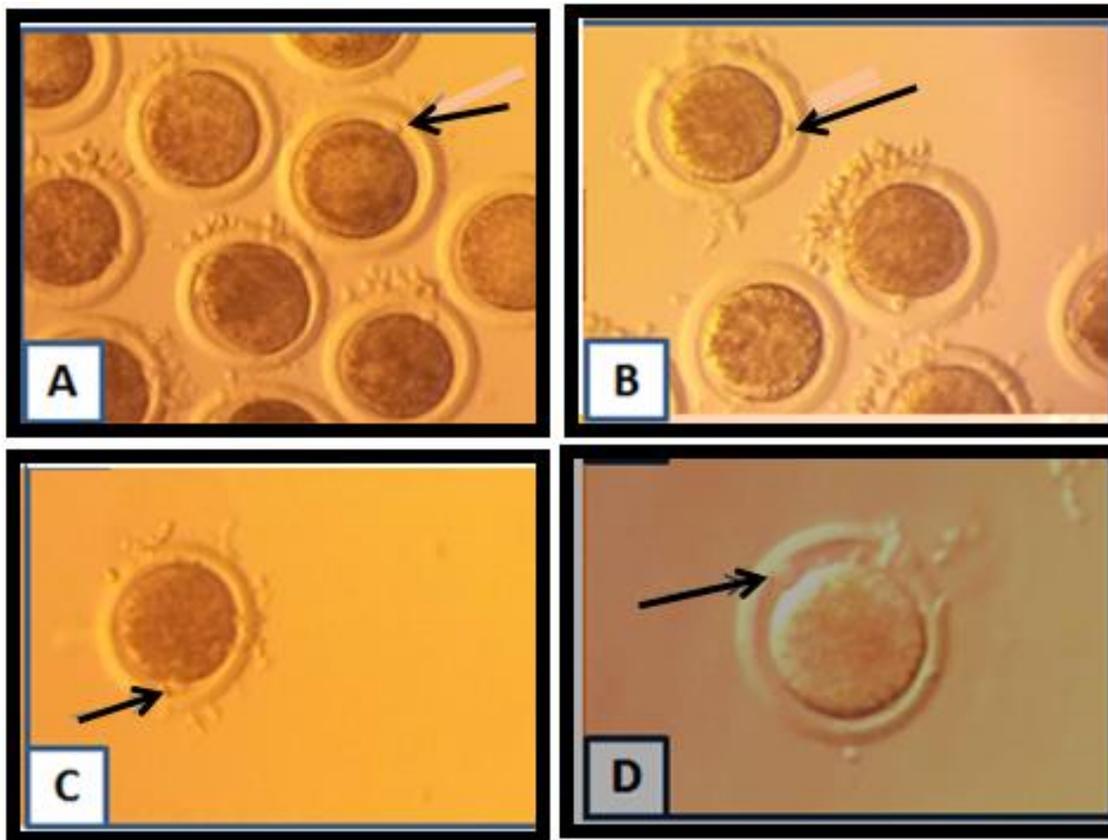


Figura 12 – Extrusão do 1º corpúsculo polar em oócitos maturados em meio de MIV CONTROLE (A), oócitos selecionados para maturação nos meios de MIV condicionados COND-24h (B), COND-48h (C) E COND-72h (D).

**Tabela 1** – Maturação nuclear de oócitos bovinos após 24 horas de maturação em meio de MIV condicionado com MSC-adb, através da visualização do 1º corpúsculo polar nos quatro grupos experimentais.

<b>GRUPOS</b>	<b>Nº de oócitos</b>	<b>Nº oócitos maturados (%)<sup>1</sup></b>
<b>CONTROLE</b>	105	88 (83,7)
<b>COND-24h</b>	116	92 (77,7)
<b>COND-48h</b>	112	91 (81,4)
<b>COND-72h</b>	117	89 (76,1)

Grupo CONTROLE = oócitos bovinos maturados por 24h em meio padrão (TCM-199, 10% SFB, PMSG e HCG) Grupos COND-24h, COND-48h e COND-72h = oócitos bovinos maturados por 24h. <sup>1</sup>Valor percentual calculado sobre o número de oócitos selecionados para maturação em meio de MIV.

No segundo dia após ativação partenogênica foi avaliada a partenogênese nos grupos experimentais (Figura 15). Não foi observada diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre as taxas de clivagem do grupo CONTROLE e dos demais grupos com meio condicionado com MSC-adb (Grupos: COND-24h, COND-48 h e COND-72h) como evidencia a Tabela- 2.

Também foi observada a presença de blastocistos no sétimo dia de cultivo (Figura 16). Da mesma forma, não foi observada diferença ( $p > 0,05$ ) de taxas de blastocisto ao comparar os grupos controle e os demais grupos condicionados com MSC-adb. Na Tabela- 2 são apresentados os dados de clivagem (D2), formação de blastocistos (D7) e eclosão dos embriões partenogênicos (D8), avaliados no segundo, sétimo e oitavo dia após a ativação, respectivamente. Ainda na Tabela 2, foram incluídos dados de um grupo

adicional: Meio de MIV fresco (CONTROLE-fres) que se trata do meio de maturação usual do laboratório com a forma de armazenamento apenas por resfriamento.

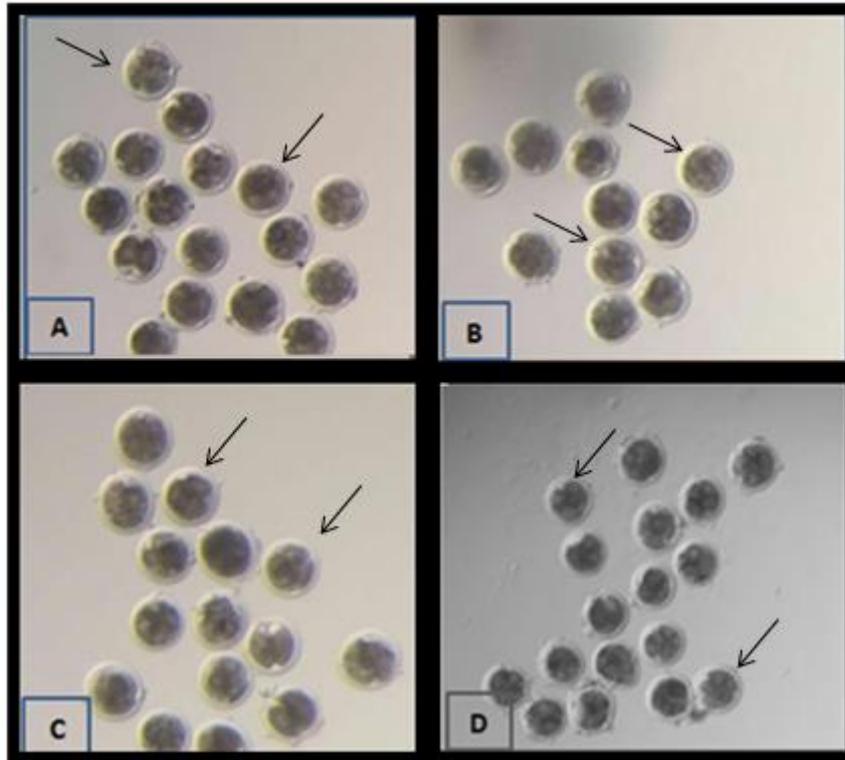


Figura 13: Clivagem por ativação partenogenética nos grupos CONTROLE (A), COND-24h (B), COND-48h(C), COND-72h (D). Evidenciando a existência de 4 a 8 blastômeros em todos os grupos experimentais.

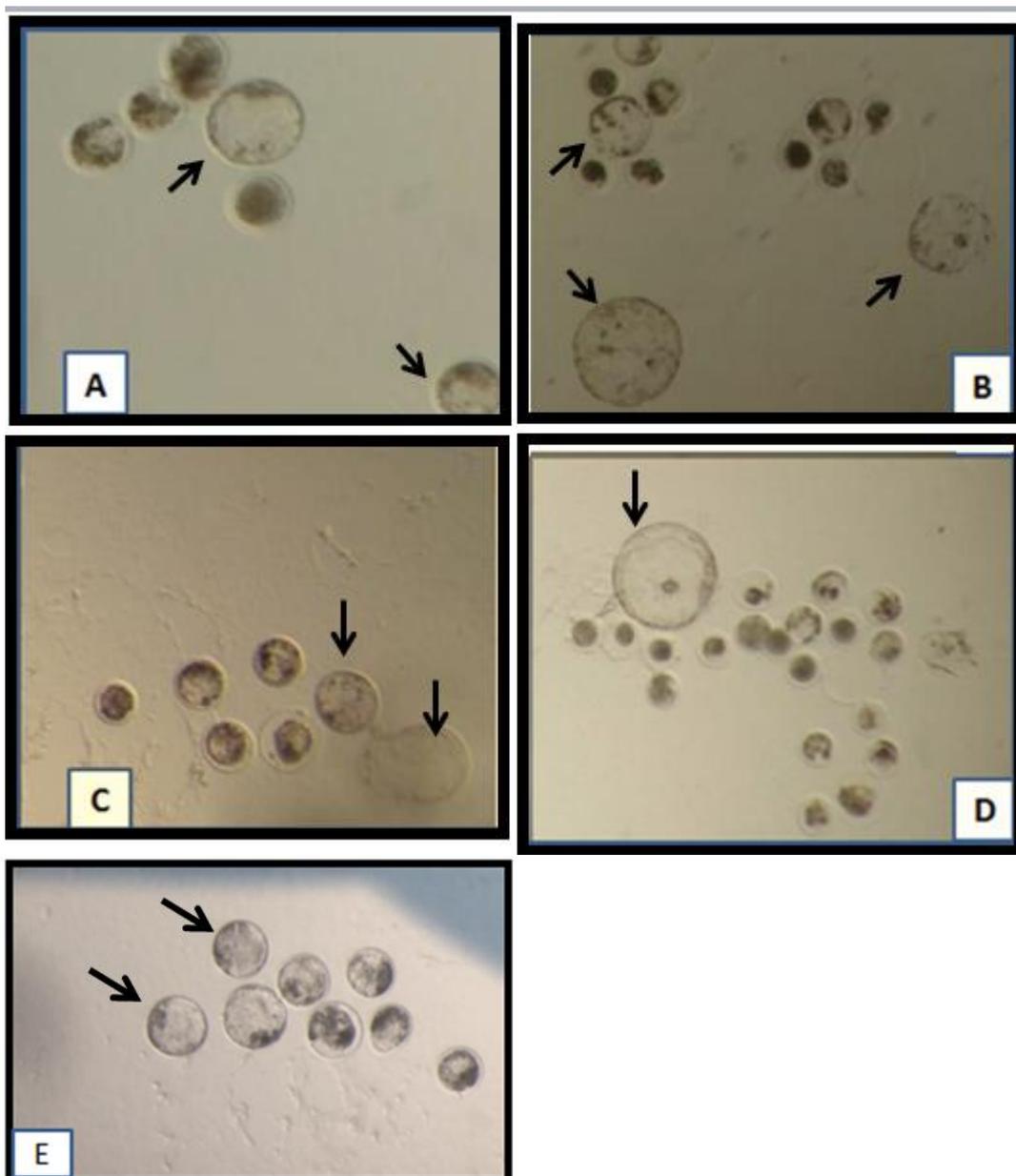


Figura 14: Produção embrionária após ativação partenogénica nos grupos CONTROLE (A), COND-24h (B), COND-48h (C), COND-72h (D), CONTROLE fres (E).

**Tabela 2** – Taxas de clivagem, formação e eclosão de embriões bovinos oriundos de oócitos maturados *in vitro* em meio de MIV condicionado por MSC-adb.

	n	Clivados (%)	Blastocistos (%)	Eclodidos (%) <sup>1</sup>
CONTROLE fres	19	17 (89,4)	8 (42,1) <sup>a</sup>	6 (75,0) <sup>b</sup>
CONTROLE cong	48	42 (87,5)	10 (23,8) <sup>a</sup>	8 (80,0) <sup>a</sup>
COND-24h	46	40 (86,9)	11 (27,5) <sup>a</sup>	10 (90,0) <sup>a</sup>
COND-48h	50	37 (74,0)	9 (18,0) <sup>a</sup>	8 (88,8) <sup>a</sup>
COND-72h	56	45 (80,3)	11 (19,6) <sup>a</sup>	9 (81,8) <sup>a</sup>

Avaliação do desenvolvimento embrionário bovinos, provenientes de oócitos maturados em meio de MIV condicionado por MSC-adb em três repetições. <sup>1</sup>Valor percentual calculado sobre o número de blastocisto. Letras diferentes em mesma coluna indicam diferença estatística (teste Fisher  $p < 0,05$ ).

## 8. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados evidenciam que o cultivo de células tronco MSC-ad bovino apresentou após as primeiras 24 horas de cultivo pequenas estruturas celulares com

morfologia uniforme e semelhantes a fibroblastos. Morfologia esta consistente e relatada por Danovis e Bland (2009) ao trabalharem com cultura de MSC-ad de humanos e roedores, assim como por outros estudos relatados abaixo.

A capacidade de aderência à superfície plástica, expressão de marcadores de superfície de membrana e potencial de diferenciação em multilinhagens, (especificamente osteoblastos, adipócitos e condrócitos) têm sido propostos como critérios mínimos para caracterizar as células tronco mesenquimais de acordo com a Sociedade Internacional de Terapia Celular (Dominici, 2006), no ano de 1966 os pesquisadores Rodbeel e Jones foram os primeiros a descrever as possíveis três formas de diferenciação das células tronco de camundongos nas seguintes linhagens: osteogênica, condrogênica e adipogênica.

Bravo *et.al.* (2012) ao trabalharem com tecido adiposo de equino conduziram o estudo sobre estudo de isolamento, cultivo e caracterização e confirmaram a existência da linhagem de CT de diferenciação celular em linhagem condrogênica, adipogênica e osteogênica. Recentemente Chun-yu *et. al.* (2015) confirmaram que células tronco derivadas de tecido adiposo humano assegurou e confirmou a capacidade de aderência ao plástico, expressão de marcadores de superfície e potencial de diferenciação multilinhagens (osteoblastos, adipócitos e condrócitos).

O primeiros relato de existência de células tronco em tecido adiposo de bovino foi feito por Picou no ano de 2009 utilizando o método de extração enzimático com a enzima colagenase tipo 1. No presente estudo, utilizamos tecido adiposo bovino (*Bos taurus indicus*) para o isolamento de células tronco mesenquimais, analisando e confirmando os parâmetros de aderência e diferenciação em multilinhagens (condrogênica, adipogênica e osteogênica). Sendo assim, ao confirmar a multipotência das células tronco isoladas neste estudo prosseguimos com o seu uso na PIVE. Ao trabalhar com MSC's derivadas de tecido adiposo Chun-yu *et. al.* (2015) relataram que este grupo celular possui maior potencial proliferativo ao longo das passagens, contabilizando em sua cultura experimental um total de  $17.2 \times 10^4 \pm 0.3$  células tronco MSC-ad na passagem cinco (P5). A curva de crescimento celular desde estudo, feito em uma única passagem (P4) contabilizou o máximo de  $7,2 \times 10^4$  por  $\text{cm}^2$ . Uma possível explicação para pode ser que fatores de

crescimento ricos em *human platelet lysat* foram utilizados em substituição do SFB no meio de cultivo celular estimulando a proliferação da colônias. Em nosso estudo suplementamos nosso meio de cultivo DMEM com 10% de SFB somente.

Nossa principal hipótese para o uso de meio condicionado por MSC-ad na produção *in vitro* de embrião, especificamente na etapa de maturação *in vitro* era que fatores produzidos pelas MSC-ad pudessem melhorar a produção de embrião em termos de taxa de blastocisto ou mesmo qualidade embrionária. Por fatores parácrinos entende-se diferentes tipos de citocinas, tais como fatores de crescimento e citocinas inflamatórias (Jiang, 2014). Em estudos clínicos foi relatado que MSC-ad que ao utilizar células tronco mesenquimais para condicionar meios em modelos experimentais de lesão aguda do órgão humano, Khubutiya (2014) e Xagorari (2013) relataram a ocorrência de mecanismos parácrinos entre as células tronco que foram relacionadas com a diminuição de patologia.

Em nosso estudo utilizamos 8.000 MSC-ad/ml para condicionar o meio de MIV, observando que os grupos tratados com meio condicionado não diferiram do grupo controle e nem entre si. Ling (2008) trabalharam com meio de MIV condicionado para avaliar a maturação nuclear de oócitos de camundongo, ele utilizou 300.000 células/ meio de maturação, obtendo 82,9% de maturação nuclear em comparação a outros grupos do seu experimento, por exemplo, o grupo maturado com DMEM cuja taxa de maturação 54,7%.

Rauber *et. al*, 2003, avaliaram o efeito do congelamento do líquido folicular (-20°C) obtido de folículos de 2-8mm de vacas, sobre a taxa de produção embrionária e constataram redução da taxa de eclosão de blastocisto (18.8%) comparado ao grupo controle fresco de 23,6%. Em nosso estudo quando avaliada a clivagem, formação de blastocisto e eclosão de embriões partenogênicos derivados de oócitos maturados em meio congelado observamos que as taxas não diferiram entre si quando comparadas entre os grupos experimentais, porém, observamos uma tendência de queda da taxa de blastocisto ao usar meio condicionado e congelado, em comparação ao meio de MIV fresco. Vale salientar que várias proteínas podem desnaturar durante o processo de congelamento-descongelamento, comprometendo sua estabilidade ao longo do armazenamento.

Gonçalvez, 2009, descreve biomoléculas presentes no líquido folicular, sendo composto por uma variedade de proteínas, fatores de crescimento, citocinas, esteróides, substratos energéticos e muitas outras substâncias ainda não identificadas, que controlam o desenvolvimento oocitário. Blaglio *et. al.* 2012, relatam que as MSC-ad agem na reparação tecidual através da sua ação parácrina, fornecendo o microambiente trófico e sinais de sobrevivência, incluindo fatores de crescimento e citocinas. Moshkdanian *et. al.* 2011 trabalhando com condicionamento de meio por células tronco mesenquimais derivadas do cordão umbilical humano a uma densidade inicial de  $1 \times 10^6$  por ml de meio (MEM-suplementado com 10% de SFB, penicilina e estreptomicina), mantendo sob cultivo até atingirem a semi-confluência de 90% onde ocorreu a renovação do mesmo meio permanecendo sendo condicionado por 24 horas, com posterior centrifugação do mesmo a 500 X g, e utilizado imediatamente na PIVE, tendo como resultados sobre a taxa de eclosão de blastocisto de camundongo nos grupos com meio condicionado, grupo com co-cultivo e grupo controle: 35%, 43% e 53% respectivamente, ainda evidenciou a redução do número de blastômeros em zigotos de camundongos. Em nosso estudo este fato não foi confirmado, pelos dados apresentado é possível afirmar que a utilização do meio condicionado na MIV não interferiu na progressão do desenvolvimento embrionário até a clivagem dos prováveis embriões, visto que observamos em D2 o número de blastômeros semelhante nos grupos condicionados quando comparados ao grupo controle. Porém quanto à formação de blastocisto é incerto afirmar que não houve interferência uma vez que as taxas foram reduzidas por igual em todos os grupos experimentais, incluindo o grupo controle congelado quando comparado ao grupo controle fresco.

No entanto, devido ao número amostral baixo do grupo com meio de MIV fresco não podemos afirmar que o processo de congelamento tenha sido responsável pela tendência observada. Tendo em vista que a utilização de meio condicionado na etapa de MIV não influenciou nas taxas de maturação nuclear dos oócitos bovinos. Especulamos que as biomoléculas, citocinas e fatores de crescimento secretados pelas MSC-ad não foram capazes de melhorar a competência oocitária durante a MIV de oócitos bovinos.

## 9-. CONCLUSÃO

Em conclusão, a utilização de meio de MIV condicionado com células tronco MSC-Ad não melhorou as taxas de desenvolvimento embrionário em bovinos. Em comparação como meio de MIV convencional, não condicionado e não congelado, apresentou taxas inferiores de formação de blastocisto. Estudos futuros deverão ser realizados para investigar se as células MSC-ad realmente secretam fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas no meio TCM-199 condicionado.

## 10- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADONA, P.R.; LEAL, C.L.V. 2006. Effect of concentration and exposure period to butyrolactone I on meiosis progression in bovine oocytes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, p. 354-359.

ALBERTINI D. F. 1992. Cytoplasmic microtubular dynamics and chromatin organization during mammalian oogenesis and oocyte maturation. **Mut Res**, v.296, p.57-68.

AMORIN, Bruna. *et al.* Células-Tronco Mesenquimais – Caracterização, Cultivo, Propriedades Imunológicas E Aplicações Clínicas. **Revista HCPA**. 71-812012.2012 Disponível em: <http://seer.ufrgs.br/index.php/hcpa/article/view/24364/16464>. Acesso 04.07.2015.

ARRUDA, R.P. *et al.* Aspects related to the technique and the utilization of sexed Semen In Vivo And In Vitro. **Animal Reproduction**, V.9, P.345- 353.2012

BAGLIO S.R.; Pegtel D.M. 2012. Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. **Frontiers in Physiology** 3-359.2012 Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3434369/>. Acesso 10.10.2015.

BAUER- Kreisel P.; GOEPFERICH A.; BLUCK T. 2010. Cell-delivery therapeutics for adipose tissue regeneration. **Advanced Drug Delivery Reviews**. p 1-15.

BLANCO, M. R., DEMYDA, S., MORENO Millán, M., GENERO, E. 2011. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: Review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, v.6, n.7, p.155-165.

BOBIS, S. *et al.* 2006. Mesenchymal stem cells: characteristics and clinical applications. *Folia Histochemica. Cytobiological*, v.44, p.215-230.

BOLS P.E.. High throughput non-invasive oocyte quality assessment: the search continues. *Animal Reproduction*.9(3):420-25. 2012.

BRAVO M.O. *et al.*, Isolamento, expansão e caracterização de células tronco do tecido adiposo de equinos. *Ars Vet.* 28(2):66-74. 2012

CAIXETA, E.S. 2012. **Regulação da expressão de fatores secretados pelo oócito (FSOs) e seus receptores durante a maturação in vitro (MIV) bovina e ações no controle da expansão do cumulus.** Tese Doutorado. Disponível em: [http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102434/caixeta\\_es\\_dr\\_botib.pdf?sequence=1](http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102434/caixeta_es_dr_botib.pdf?sequence=1). Acesso: 02.09.2015

CAMPOS, Carolina Oliveira. *et. al.* The influence of interaction between oocyte and granulosa cells on the results of procedures in assisted reproduction. **FEMINA**; vol 39 - nº 42011. 2011. Disponível em: <http://files.bvs.br/upload/S/0100-7254/2011/v39n4/a2484.pdf> 2011. Acesso em: 14.05.2016

CHAVES R.N; DUARTE A.B.G.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. 2010. Systems in vitro development of immature oocytes of mammals **Rev. Bras. Reprod. Animal**, Belo Horizonte, v.34, n.1, p.37-49. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Acesso em: 04.09.2015

CHIAN R.C, BUCKETT W.M, Tan S.L. In-vitro maturation of human oocytes. **Reprod Biomed Online**. 2004; 8: 148-166.

CHUN-YU, Li. *et al.* Comparative analysis of human mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue under xeno-free conditions for cell therapy. **Stem Cell Research & Therapy** 2015;6:55DOI: 10.1186/s13287-015-0066-5. Disponível em: <http://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13287-015-0066>

COSTA, N. N. *et al.* Effect of cortisol on bovine oocyte maturation and embryo development in vitro. **Theriogenology**. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26456184> 2015: Acesso em: 31.10.2015

DANOVIZ M.E. *et al.* Rat adipose tissue-derived stem cells transplantation attenuates cardiac dysfunction post infarction and biopolymers enhance cells retention. **PLoS One**. 2009;5 (8) e 12077.

Da Silveira, J. C., Veeramachaneni, D. N., Winger, Q. A., Carnevale, E. M., & Bouma, G. J. (2012). Cell-secreted vesicles in equine ovarian follicular fluid contain miRNAs and proteins: a possible new form of cell communication within the ovarian follicle. **Biology of Reproduction**, 86, 71.

DOMINICI M. *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**. 2006;8:315–7.39.

DURANTHON V., WATSON J.A., LONERGAN P. 2008. Preimplantation embryo programming: transcription, epigenetics, and culture environment. **Reproduction**, 135: 141-150

FERREIRA, Elisa M. *et al.* Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: acquisition of competence for development. **Rev Bras Reprod Animal**, Belo Horizonte, v.32, n.3, p.172-181. 2008. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Acesso em: 12.07.2015

FONSECA, Emerson A. da; 2014. **Desenvolvimento De Nanocompósito A Base De Policaprolactona E Nanotubo De Carbono Para A Diferenciação Neuronal De Células-Tronco Humanas Do Tecido Adiposo**. Dissertação De Mestrado UFMG. Disponível em: <http://Www.Bibliotecadigital.Ufmg.Br>. Acesso Em: 02.09.2015.

FRIGONI, N.A.S.R.. *et al.* In vitro production of sheep embryos: advances and challenges. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, 2008. Belo Horizonte, v.38, n.2, p.103-109. Disponível em [www.cbra.org.br](http://www.cbra.org.br). Acesso em: 02.09.2015.

FRUHBECK G. *et al.* The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. 2001. **Physiol Endocrinol Metab.**; 280:E827-47.

GALINDO, Layla T. Estudo dos efeitos parácrinos de citocinas expressas por células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea sobre células-tronco neurais. 2011. Disponível em: <http://www.bv.fapesp.br>. Acesso 20.09.2015.

GAUTIER J, MALLER JL. Cyclin B in *Xenopus* oocytes: implications for the mechanism of pre-MPF activation. 1991.. **Embryo J**, v.10, p.177-182.

GILCHRIST R.B, RITTER L.J, ARMSTRONG D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science** 82–83 -2004 431–446.

GONÇALVES, Monaliza C. Criopreservação de oócitos e embriões bovinos: efeito do líquido folicular e do beta mercaptoetano. Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV-UDESC), Tese de mestrado. 2009. Lages-SC

GOTTARDI, F.P. 2009. **Inibição da maturação nuclear pela butirolactona I durante o transporte de oócitos bovinos destinados à produção in vitro de embriões (PIV)**. Jaboticabal: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, 2009. 74p. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista. Disponível em: <http://www.fcav.unesp.br/download/pgtrabs/ra/m/3709.pdf>.

GUEMRA S. *et al.*; Maturação in vitro de oócitos bovinos em meios suplementados com quercetina e seu efeito sobre o desenvolvimento embrionário. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.65, n.6, p.1616-1624, 2013. Disponível em <http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v65n6/05.pdf>. Acesso em: 10.09.2015.

HOMA, S.T. Calcium and meiotic maturation of the mammalian oocyte. **Molecular Reproduction and Development**, v 40, p. 122-134, 1995.

HUSS, R. 2000. Cells from various sources isolation of primary and immortalized CD34-hematopoietic and mesenchymal stem. **Stem Cells**, v.18, n.1, p.1-9. Disponível em: <http://stemcells.alphaamedpress.org/cgi/reprint/18/1/1.pdf>. Acesso 12.08.2015.

HYTTEL, P.; *et al.* Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. **Theriogenology**, v.47, p.23-32, 1997.

JIANG X. et al. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. **Cell Transplant**. 2014;23:1045–59.

JUNIOR, Francisco C. da S. ODONGO, Fatima C. A.; DULLEY, Frederico L. 2015. Hematopoietic stem cells: uses and perspectives. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. vol.31. Acesso em 10.07.2015. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-84842009000700009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842009000700009)

JUNIOR, Jurandy M. KANE.P.F.; **Métodos De Avaliação Da Eficiência Da Multiplicação Genética Por Produção De Embriões Bovinos**. 2014 Disponível: [http://www.researchgate.net/profile/Jurandy\\_Penitente-Filho/publication/264782722\\_Métodos\\_de\\_avaliao\\_da\\_eficiencia\\_da\\_multiplicao\\_gentica\\_por\\_produo\\_de\\_embries\\_bovinos/links/554d5baa08aeedf175638b91.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Jurandy_Penitente-Filho/publication/264782722_Métodos_de_avaliao_da_eficiencia_da_multiplicao_gentica_por_produo_de_embries_bovinos/links/554d5baa08aeedf175638b91.pdf). Acesso em 08.10.15

KAPUR, Sahil K., and Adam J. KATZ. 2013. Review of the adipose derived stem cell secretome. **Biochimie**: 2222-2228. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908413001624>. Acesso em: 13.05.2015

KAWAMURA K, Kumagai J, Sudo S, Chun SY, Pisarska M, Morita H, Toppari J, Fu P, Wade JD, Bathgate RA. 2004. Paracrine regulation of mammalian oocyte maturation and male germ cell survival. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.101, p.7323-7328.

KHUBUTIYA M.S. et al. Paracrine mechanisms of proliferative, anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of mesenchymal stromal cells in models of acute organ injury. **Cytotherapy**. 2014;16:579–85.

KIKUCHI, K. *et al.* Maturation/M-phase promoting factor: A regulator of arging in Procine oocytes. **Biology of reproduction**, Champaing, v.63, p. 715-722, 2000.

KILPINEn L. *et al.* Extracellular membrane vesicles from umbilical cord blood-derived MSC protect against ischemic acute kidney injury, a feature that is lost after inflammatory conditioning. **J. Extracell Vesicles**. 2013. 2:21927, doi: <http://journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev/article/view/21927>. Acesso em: 31.10.2015

KIM E.Y.; LEE J.B.; PARK H.Y.;. The use of embryonic stem cell derived bioactive material as a new protein supplement for the in vitro culture of bovine embryos. 2011 **J Reprod Dev**. 57(3), 346-354

KUPKER, W.; DIEDRICH,K.; EDWARDS,R.G. Principles of mammalian fertilization. **Human Reproduction**, v 13, p . 20-32, 1998.

LAI R.C.; *et al.* Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. **Stem Cell Research**, Volume 5, Issue 2, September 2010, Pages 170-17.. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21435393>. Acesso em: 01.11.2015

LCTE, Laboratório de células tronco embrionárs do Rio de Janeiro. **Células-tronco, o que são?** 2015 disponível em: <http://www.lance-ufjr.org/ceacutelulas-tronco.html>. Acesso em: 30.08.2015

LEE R.H.; *et.al.* Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG–6. 2009. **Cell Stem Cell** 5:54–63. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4154377/>. Acesso em:31.10.2015

LI G.P; *et al.* Asymmetric division of spindle microtubules and microfilaments during bovine meiosis from metaphase II to metaphase III. 2005. **Mol Reprod Dev**, v.71, p.220-226.

LING, B.; Fend, D.Q.; Zhou, Y.; Gao, T.; Wei, H.M.; Tian, Z.G.; 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.

LIU, L.; KEEFFE, D. L. . Cytoplasm mediates both development and oxidation- induced apoptotic cell death in mouse zygotes. *Biology of reproduction*, Cambridge, V.62, p.1828-1834, 2004.

MACHATY Z, PEIPPO J, PETER S. Production and manipulation of bovine embryo: techniques and terminology. **Theriogenology**. 78:937-950- 2012.

MACHATY Z, PRATHER R.S. Strategies for activating nuclear transfer oocytes. **Reprod Fertil Dev** 1998; **10**:599–613

MAMBELLI, L.I. *et al.* **Characterization of equine adipose tissue-derived progenitor cells before and after cryopreservation. tissue engineering**, v.15, n.1, p.87-94, 1999.

MARCIEL, Karina A. ; GOMES, Márcio G. T.; DIAS, Francisca E. F.;. 2012. **Efeito de dois diferentes protocolos para congelamento lento de embriões bovinos produzidos in vitro na região da Amazônia Legal**. Disponível em: <http://www.site.uft.edu.br> Acesso em: 02.09.15

MEIJER, L.; PONDEVEN, P. . Cyclic activation of histone H1 kinase during sea urchin egg mitotic divisions. **Experimental Cell Research**, v 174, p . 116-129, 1998.

MEIRELLES L. da Silva, *et al.* Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. **Cytokine Growth Factor Rev**. 2009;20:419–27.

MEIRELLES, L.S. et al. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. **Stem Cells**, v.26, p.2287-2299. 2008. Disponível em: <http://stemcells.alphamedpress.org/cgi/content/abstract/2007-1122v1>. Acesso em: 23 set. 2015. doi: 10.1634/stemcells.2007-1122.

MILLER J.B.; RUSSELL P. The cdc 25 M-phase inducer: an unconventional protein phosphatase. **Stem Cell**, v.68, p.407- 410, 1992.

MINGOTI, G. V. 2005. **Aspectos técnicos da produção in vitro de embriões bovinos**. In: I Simpósio tópicos avançados em Biotecnologias da Reprodução. UNESP, Campus de Jaboticabal.

MORINI, A. C. **Desenvolvimento embrionário em búfalos (Bubalus bubalis Linnaeus)**, Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo. 2000. Disponível em: <http://www.teses.usp.br>. Acesso em: 04.10.2015.

MOSHKDANIAN, G.; NEMATOLLAHI-MAHANI, S. N.; POUYA, F. Antioxidants rescue stressed embryos at a rate comparable with co-culturing of embryos with human umbilical cord mesenchymal cells. 2011. **Journal of assisted reproduction and genetics**, 28(4), 343-349

MOUSSA, M.; et al. Maternal control of oocyte quality in cattle “a review”. 2015. **Animal reproduction science**, 155, 11-27. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378432015000238>. Acesso em: 31.10.2015

NASCIMENTO, Hamilton Silva do. 2014. **Co-cultivo de embriões bovinos com células-tronco adultas derivadas de tecido adiposo**. 2014. Disponível em: [www.portal.ufpa.com](http://www.portal.ufpa.com).

NASCIMENTO, Herrmano Rodrigues do; MOURA Marcos A. de A. . Bioética e o avanço da ciência nas descobertas das células-tronco: células-tronco estaminais e embrionárias. 2015. **Biblioteca online PUCSP**. Disponível em: <http://revistas.pucsp.br/index.php/culturateo/article/view/21656>..Acesso em: 28.10.2015

NIEMANN, H. WRENZYCKI, C. 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. 2000.

OLIVEIRA, LIDIANE DA C. 2012. **Influencia de enxerto de tecido adiposo autógeno no reparo ósseo de defeito de tamanho critico: Estudo histológico e histometrico em calvarias de coelho.** Tese de Mestrado Universidade Positivo do Paraná. Disponível em: <http://www.teatropositivo.com.br/painelgpa/uploads/imagens/files/Dissertação.PDF>. Acesso em: 14.09.2015.

OSBORNE, T.F. 2000. Sterol regulatory elemento binding proteins (SREBPS): Key regulation of nutritional homeostasis and insulin action. **J. Biol chen** 275 (32): 379- 82. Disponível em: <http://www.jbc.org/content/275/42/32379.short>. Acesso em: 26.09.2015

OZAKI K. et al. Mechanisms of immunomodulation by mesenchymal stem cells. **Int J Hematol.** 2007;86:5–7.

PARK, H. Y.;et al. Effect opf human Tissue-Derived Mesechymal-stem-cell bioactive materiais on porcine embryo development. 2013. **Molecular Reproduction & development.** Volume 80, Issue 12, pages 1035-1047.

PICOU, A. A. The isolation and Characterization of bovine adult derived stem cells for the use in nuclear transfer.. Thesis submitted to the graduate faculty of the Lousiana States University and Agricultural an Maechanical College in partial fulfilmente of requeriments for the degree of Master of Science .**In the Interdepartmental Program of Scoll. Of Animal Sciences**, pp. 28 e 31. 2009.

PORCIUNCULA, Patricia M.; **Ativação partenogénica de oócitos bovinos jovens com ionomicia e 6 dimetilaminopurina associado ou não ao estrôncio.** Dissertação de Mestrado apresentada a Universidade de São Paulo- 2007;

RAUBER LP, Alves DF, Figueirã<sup>3</sup> GM, Brum DS, Hilgert TF, Bernardi ML, Silva CAM, Rubin MIB (2003). Embryo development of bovine oocytes held in follicular fluid from bovine follicles of different diameters. *Braz. J Vet. Res. Anim. Sci.* 40:169-177.

SÁ, Natan M. de. **Discurso, biotecnociência e biótica: análise dos discursos morais acerca de células-tronco em mídia de massa.** 2012. Tese Doutorado—Universidade de Brasília.

SAKAGUCHI M, et.al. A combination of EGF and IGF-I accelerates the progression of meiosis in bovine follicular oocytes in vitro and fetal calf serum neutralizes the acceleration effect. **Theriogenology.** 2000. 54: 1327-1342. (A).

SAKAGUCHI M. et al. Possible mechanism for acceleration of meiotic progression of bovine follicular oocytes by growth factors in vitro. **Reproduction** 2002; 123: 135-142. (B).

SAMPAIO R.V.; et al. MT3 melatonin binding site, MT1 and MT2 melatonin receptors are present in oocyte, but only MT1 is present in bovine blastocyst produced in vitro. 2012. **Reprod Biol Endocrin.**

SÁNCHEZ F, Smitz J.. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta.** 2012. 1822(12):1896–1912.

SILVA, Carolina Gonzales da. **Isolamento, criopreservação e utilização de células do cordão umbilical, células do tecido adiposo e células do líquido amniótico para produção de embriões bovinos por transferência nuclear (clonagem).** 2013 (A).

SILVA, Jorge Dias Da.. **Análise mercadológica de embriões zebuínos produzidos a partir da técnica de fertilização in vitro.** 2009. Disponível Em <Http://Simaoedias.Com/Mercado%20de%20embri%C3%B5es.Pdf> : Visualizado Em : 21.09.15

SOARES, Anna C. R. P. Células tronco - Revisão. **webartigos.2010**.  
<http://www.webartigos.com/artigos/celulas-tronco/32338/#ixzz49UEIMtqr>

SOUZA, Cristiano Freitas de; et al.. Células-tronco mesenquimais: células ideais para a regeneração cardíaca? **Rev. Bras. Cardiol. Invasiva** vol.18 no.3.2010 Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?> . Acesso: 18.09.2015

STILLAERT F, Findlay M, Palmer J, Idrizi R, Cheang S, Messina A.2007. Host rather than graft origin of Matrigel-induced adipose tissue in the murine tissue-engineering chamber. **Tissue Eng.** 13, 2291–2300.

SUGII S.; et al. Human and mouse adipose-derived cells support feeder dependent induction of pluripotent stem cells. **Proc. Natl. Acad.** 2010

TAKADA, Luciana. 2008. **Efeito da melatonina sobre a maturação dos ovócitos em sistema tradicional de produção**. Tese de Doutorado- USP. Disponível em : <http://www.teses.usp.br/teses> . Acesso em 01.09.2015.

TAKAGI, M.; et al. Impaired final follicular maturation in heifers after superovulation with recombinant human FSH. 2001. **Reproduction**. Cambridge, v. 121, n. 6, p. 941-951.

TAKAHASHI, K. et al. 2007. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Stem Cell**, v.131, p.1-12. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18035408> . acesso em: 30 set. 2015.

TANAKA,H; kanagawa,H. Influence of combined activation treatment on the success of bovine nuclear transfer using young or aged oocyte. **Animal Reproduction Science**. V. 5,n.49 p , 113-123,1997.

TETTA C.; et al. The role of microvesicles in tissue repair. **Organogenesis**. 7:105–15. 2011 Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3142447>. Acesso em: 01.11.2015

VAN DEN HURK, R., Zhao, J.; Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. 2005 **Theriogenology**, v.63, p.1717- 1751.

VERLHAC,M.H.; et.al. Microtubule and chroon behavior follow MAP kinase activity by not MPF activity during meiosis in mouse oocyte. **Development**, v 120, p 1017-1025, 1994.

WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: A key mediator of oocyte and embryo developmental competence. 2007. **Journal of Animal Science**, v.85, n.13, p.E1- E3.

WU, B. et al. Dunanmics of maturation-promoting factor and its constituent proteins during *in vitro* maturation of bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, Champaing, v. 56 p. 253-259. 1997.

WU, L.; et al. Secreted factors from adipose tissue increase adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells. 2012. **Cell Proliferation**. 45, 311–319.

XAGORARi A. et al. Protective effect of mesenchymal stem cell-conditioned medium on hepatic cell apoptosis after acute liver injury. **Int J Clin Exp Pathol**. 2013;6:831–40.

YANEZ-MO M, Siljander P.R, Andreu Z, Zavec A.B, Borrás F.E, Buzas E.I..2015. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. **J Extracell Vesicles**. 4 27066. Disponível em: <http://www.journalofextracellularvesicles.net/index.php/jev/article/view/27066/0>. Acesso em: 02.11.2015

YANG, X.; et. al. Synergistic effect of ethanol an cycloheximide on activation of freshly matured bovine oocytes. **Theriogenology**, Los Altos, v. 41 p . 395-403, 1994.

YANG, X.; Kubota, C.; Suzuki, H.; Taneja, M.; Bols, P. E. J.; Presicce, G. A. 2008. Control of oocyte maturation in cows – Biological factors. **Theriogenology**, Stoneham, v. 49, p. 471-482,..

YARAK Samira; Okamoto, Oswaldo K. 2010. Human adipose-derived stem cells: current challenges and clinical perspectives. **An Bras Dermatol.** 2010;85(5):647-56.

ZANOTTI, L. et al. 2013. Encapsulated mesenchymal stem cells for in vivo immunomodulation. **Leukemia**, v. 27, n. 2, p. 500.

ZHANG, K., Hansen, P.J., Ealy, A.D. 2010. Fibroblast growth factor 10 enhances bovine oocyte maturation and developmental competence in vitro. **Reproduction**, v. 140, p. 815–826.

ZUCCONI, E. et al.2009. Mesenchymal stem cells derived from canine umbilical cord vein - a novel source for cell therapy studies. **Stem Cells and Development, in proof**, p.1-33. Disponível em: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/scd.2008.0314>. Acesso em: 01 Outubro. 2015.

ZUTION, Marília S. S. R.et al.; Células-Tronco de Tecido Adiposo e a Importância da Padronização de um Modelo Animal para Experimentação Pré-Clínica. **Rev Bras Cardiol Invasiva.** 21(3):281-7. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbci/v21n3/15.pdf>. Acesso: 08.10.2015