

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO - UNIFENAS  
SÁVIO CARNEIRO MARTINS

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS USANDO CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS DE RATO E FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIAS DE  
CAMUNDONGOS

ALFENAS – MG

2015

SÁVIO CARNEIRO MARTINS

DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS USANDO CÉLULAS-  
TRONCO MESENQUIMAIS DE RATO E FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIAS DE  
CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada à Universidade  
José do Rosário Vellano, como parte das  
exigências de conclusão do curso de  
mestrado em Reprodução, Sanidade e  
Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Co-orientadora: Dra. Jasmin

Alfenas – MG

2015

Martins, Sávio Carneiro

Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos usando células-tronco mesenquimais de rato e fibroblastos embrionárias de camundongos.—Sávio Carneiro Martins.-- 2015.  
65 f.

Orientador: Prof. Dr Luiz Sérgio de Almeida Camargo  
Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-graduação  
em Reprodução, Sanidade e Bem-estar animal -Universidade  
José do Rosário Vellano, Alfenas, 2015.

1 .PIV de embriões bovinos 2. Camada de alimentação 3. Células-tronco mesenquimais 4. Fibroblastos embrionário de camundongo  
I. Universidade José do Rosário Vellano II. Título  
CDU : 636.082(043)



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**Título:** "DESENVOLVIMENTO *IN VITRO* DE EMBRIÕES BOVINOS USANDO CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS DE RATO E FIBROBLASTOS EMBRIONÁRIAS DE CAMUNDONGOS".

**Autor:** Sávio Carneiro Martins

**Orientador:** Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM REPRODUÇÃO, SANIDADE E BEM-ESTAR ANIMAL** pela Comissão Examinadora.

Prof. Dr. Luiz Sérgio de Almeida Camargo  
Orientador

Profa. Dra. Fabiana Cristina Varago

Prof. Dr. Ribrio Ivan Tavares Pereira Batista

Alfenas, 30 de março de 2015.

Prof. Dr. Mário Sérgio Oliveira Swerts  
Diretor de Pesquisa e Pós-Graduação  
UNIFENAS

Dedico esta dissertação primeiramente  
a Deus, à minha família, aos meus  
amigos, aos meus amigos de Mestrado,  
ao professor Délcio Bueno da Silva e a  
Dra. Jasmin e, por fim, ao meu  
orientador. Todos estes, sem dúvida  
nenhuma, me deram apoio, força,  
incentivo, companheirismo e amizade.  
Sem eles nada disso seria possível.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais César e Mary, ao meu irmão Lucas, aos meus avós Zé Gabiru e Nadir e as minhas tias Nilce e Miriam, pelo apoio para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Agradeço à minha noiva Livia por me suportar nos momentos de estresse e por me apoiar e incentivar na conclusão deste trabalho.

Agradeço de maneira singular à minha co-orientadora Jasmin, pela dedicação e disposição em estar sempre pronta para me ajudar nesse trabalho.

Ao meu ex-professor e amigo Délcio Bueno da Silva, pelos ensinamentos e por acreditar em mim.

Ao meu orientador professor Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pelos ensinamentos ao longo do curso de mestrado.

À Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) pela oportunidade oferecida.

"Onça fala manso que fala: a selva  
incendiou! Bicho que veste pele de  
onça, ele começou. Bicho sem luz nos  
olhos, não sabe a maldade que faz,  
rasga na floresta um rio só de poeira,  
que vem boi e que vai madeira, começa  
e não para mais".

César Dameire

## RESUMO

Diante da importância da produção *in vitro* de embriões (PIVE) na expansão do melhoramento genético, é importante a busca de inovações tecnológicas que possam potencializar o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Fibroblastos embrionários de camundongo (MEFs) têm sido amplamente utilizados como camada alimentadora para suportar as células-tronco embrionárias, devido à sua liberação de fatores de crescimento. As células-tronco mesenquimais (MSCs) identificadas a partir de diferentes fontes, também liberam fatores bioativos que possam suportar o crescimento celular. Este estudo tem como objetivo investigar o efeito da co-cultura de MSC de medula óssea de rato ou MEF como fonte alimentadora na produção *in vitro* de embriões bovinos. Complexo cumulus oophorus foram maturados em três grupos distintos: Controle (CTRL), co-cultura com monocamada de células mesenquimais de ratos (MSC) ou co-cultura com monocamada de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF). A fecundação foi realizada em condição controle para todos os grupos e os embriões fecundados *in vitro* foram também cultivados a partir do quarto dia em CTRL, co-cultura com MSC ou co-cultura com MEF, formando os seguintes grupos experimentais: (CTRL/CTRL) – maturação e cultivo embrionário em condições CTRL; (CTRL/MSC) – maturação em CTRL e cultivo embrionário em MSC a partir do quarto dia após o início do cultivo embrionário *in vitro*; (CTRL/MEF) – maturação em CTRL e cultivo embrionário em MEF a partir do quarto dia após o início do cultivo embrionário *in vitro*; (MSC/CTRL) – maturação em MSC e cultivo embrionário em CTRL; (MSC/MSC) – maturação e cultivo embrionário em MSC a partir do quarto dia após o início do cultivo embrionário *in vitro*; (MEF/CTRL) – maturação em MEF e cultivo embrionário em CTRL e (MEF/MEF) – maturação e cultivo embrionário em MEF a partir do quarto dia após o início do cultivo embrionário *in vitro*. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os oócitos dos grupos CTRL, MSC e MEF, na taxa de estruturas em metáfase II, apoptose e clivagem nos embriões de 4 dias após o início do cultivo *in vitro*. O número de células da massa celular interna, células do trofoblasto, células em apoptose e células totais foram iguais ( $P>0,05$ ) entre os embriões dos diferentes grupos experimentais. As taxas de embriões em estágio de blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodido e blastocistos totais dos grupos experimentais não se diferiram ( $P>0,05$ ) no sétimo dia de cultivo embrionário. No

oitavo dia de cultivo embrionário houve diferença ( $P < 0,05$ ) da taxa de blastocisto eclodido, sendo maior no grupo CTRL/CTRL quando comparado ao grupo MSC/MSC; no entanto, a proporção de blastocisto, blastocisto expandido e blastocistos totais não foram diferentes ( $P > 0,05$ ) entre os grupos experimentais. Concluímos que não houve melhora significativa no desenvolvimento embrionário bovino utilizando co-culturas com MSC de ratos ou MEF de camundongos, quando comparado com sistema de cultura controle. Entretanto, mais estudos investigando o uso de células-tronco de outras fontes ou seu meio condicionado são necessários para se entender melhor o efeito destas células no desenvolvimento embrionário.

Palavras-chave: PIV de Embriões bovinos, camada de alimentação, células-tronco mesenquimais, fibroblastos embrionários de camundongo.

## ABSTRACT

Due to the importance of *in vitro* embryo production (IVEP) to accelerate genetic improvement is important the search for technological innovation that can enhance the *in vitro* embryo development. Mouse embryonic fibroblasts (MEFs) have been widely used as a feeder layer to support embryonic stem cells due to their release of growth factors. Mesenchymal stem cells (MSCs) from different sources were also found to release bioactive factors that can support cell growth. This study aims to investigate the effect of co-culture of MSC from rat bone marrow or MEF as a feeder source for *in vitro* production of bovine embryos. Cumulus oophorus complexes were matured into three groups: control (CTRL), co-culture with monolayer of mesenchymal cells of rats (MSC) or co-cultured with monolayer of embryonic fibroblasts of mice (MEF). Fertilization was performed in control condition for all groups, and *in vitro* fertilized embryos were cultured from fourth day on in CTRL, co-culture with MSC or co-cultured with MEF, so that the following groups were performed: (CTRL / CTRL) - maturation and embryo development in CTRL conditions; (CTRL / MSC) - maturation in CTRL and embryo development with MSC from the fourth day on after the beginning of the *in vitro* embryo culture; (CTRL / MEF) - maturation CTRL and embryo development with MEF from the fourth day on after the beginning of the *in vitro* embryo culture; (MSC / CTRL) - MSC during maturation and embryo development in CTRL; (MSC / MSC) - maturation and embryo development in MSC from the fourth day on after the beginning of the *in vitro* embryo culture; (MEF / CTRL) - maturation and embryo development in MEF and CTRL (MEF / MEF) - maturation and embryo development in MEF from the fourth day on after the beginning of embryo development *in vitro*. No significant difference was found among the oocytes matured in CTRL, MSC and MEF conditions for metaphase II and apoptosis rates and for cleavage rate in embryos at 4th day after the beginning of the *in vitro* culture. The number of cells in the inner cell mass, trophoblast cells, apoptotic cells and total cells were similar ( $P > 0.05$ ) in the embryos from all experimental groups. The rates of blastocyst formation, expanded, hatched and the total of blastocysts did not differ among experimental groups ( $P > 0.05$ ) at 7th day of embryo development. At eighth day of embryo culture we observed a difference ( $P < 0.05$ ) in hatched blastocyst rate which was higher in the CTRL /CTRL group when compared to MSC/MSC group, however, the

proportion of blastocyst, expanded and total blastocysts was not different ( $P > 0.05$ ). We conclude that there was no significant improvement in bovine embryo development using co-cultures of MSC from rats or MEF when compared to control culture system. However more studies investigating the use of stem cells from other sources or their conditioned medium are needed to better understand the effect of these cells on embryonic development.

**Key words:** PIV Bovine embryos, feeder layer, mesenchymal stem cells, embryonic mouse fibroblasts.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Proporção de oócitos em apoptose (TUNEL-positivos) após maturação <i>in vitro</i> sem co-cultura (CTRL), co-cultura com células mesenquimais de ratos (MSC) ou com fibroblastos embrionários de camundongos (MEF) .....	36
Figura 2: Avaliação do estágio de maturação de oócitos cultivados em diferentes condições experimentais.....	37
Figura 3: Análise de apoptose. ....	42
Figura 4: Marcação para massa Celular interna (SOX2) e núcleo Celular (DAPI). ....	44
Figura 5: Fotomicrografias em cofocal mostrando núcleos das células embrionárias marcados com DAPI (azul), SOX2 positivo marcando (massa celular interna em vermelho) e análise de apoptose (células TUNEL-positivas) mostrados no tom de verde de embriões nas diferentes condições experimentais.....	46

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1: Avaliação da taxa de embriões clivados após 4 dias de cultivo.....	51
Tabela 2: Avaliação dos estágios de desenvolvimento embrionário após 7 dias de cultivo. ....	51
Tabela 3: Avaliação dos estágios de desenvolvimento embrionário após 8 dias de cultivo. ...	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

% - Percentagem

µg - Microgramas

µL - Microlitros

0,9% NaCl - Solução fisiológica a 0,9%

18 g - Tamanho agulha

Ca<sup>2+</sup> - Cálcio

CCO - Complexo cumulus oophorus

CIV - Cultivo *in vitro*

CO<sup>2</sup> - Dióxido de Carbono

CT - Células-tronco

DAPI - 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM - Meio de Eagle modificado por Dulbecco

DMSO - Dimetil sulfoxido

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGF - Fator de crescimento epidérmico

FERT-TALP - Meio Tyrode modificado com albumina, lactato e piruvato, adicionado de antioxidantes

FGF-2 – Fator de crescimento fibroblástico – 2

FIV - Fecundação *in vitro*

FSH - Hormônio folículo estimulante

HGF – Fator de crescimento de hepatócitos

IGF-I – Fator de crescimento semelhante à insulina

IL-10 - Interleucina – 10

IL-6 - Interleucina – 6

iMEF - MEF mitoticamente inativados

iMSC - MSC mitoticamente inativados

LH - Hormônio luteinizante

LIF – Fator inibidor de leucemia

MAPK - Proteína cinase ativada por mitógenos

MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1

MEFs - Fibroblastos embrionárias de rato

MIV - Maturação *in vitro*

ml - Mililitros

mm - Milímetro

mM - Milimol

MPF - Fator promotor de maturação

MSCs - Células-tronco mesenquimais

nm - Nanômetro

°C – Graus Celsius

PBS - Solução de tampão fosfato

PG-E2 - Prostaglandina E2

pH - Potencial hidrogeniônico

PIVE - Produção *in vitro* de embriões

PVP - Polivinilpirrolidone

SFB - Soro fetal bovino

SOF - Fluido Sintético de Oviduto

SOFaaci - SOF acrescentado de aminoácidos essenciais e não essenciais, citrato de sódio e mioinositol

SVC - Soro de vaca em cio

TCM-199 - Meio de cultura de tecidos

TGF β 1 - Fator transformador de crescimento beta 1

TGF-β - Fator transformador de crescimento beta

TUNEL - Método Terminal desoxinucleotidil transferase DUTP rotulagem nick final

VEGF - Fator de crescimento vascular endotelial

VEGF-A - Fator de crescimento endotelial vascular A

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1. Produção <i>in vitro</i> de embriões bovinos (PIVE).....	14
2.2. Maturação oocitária.....	15
2.4. Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	16
2.6. Cultivo <i>in vitro</i> (CIV).....	17
2.7. Meios utilizados .....	17
2.8. Sistemas de cultivo.....	18
2.9. Co-cultura.....	19
2.10. Células-tronco .....	20
2.11. Célula-tronco Mesenquimal (MSC) .....	21
2.12. Fibroblasto embrionário murino (MEF) .....	23
3. OBJETIVOS .....	24
3.1 Geral .....	24
3.2 Específico.....	24
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	25
5. CAPÍTULO 1: Manuscrito a ser enviado à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira. ....	29
6. Anexos – Normas para publicação – Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira. ....	53

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui aproximadamente 211 milhões de bovinos sendo, assim, o maior rebanho comercial do mundo (IBGE, 2014). As biotécnicas reprodutivas têm assumido papel importante na melhoria do rebanho nacional. Dentre as biotécnicas aplicadas à reprodução de bovinos no Brasil, destaca-se a produção de embriões *in vivo* e *in vitro* por sua capacidade de multiplicação de descendentes e de redução do intervalo entre gerações, contribuindo para acelerar o ganho genético. No entanto, os embriões produzidos em sistema *in vitro* não se desenvolvem bem, quando comparados aos embriões obtidos a partir de fontes *in vivo*. As diferenças na produção de blastocisto de alta qualidade se dão principalmente pelas condições sub ideais que o ambiente de cultura *in vitro* oferece (POMAR et al., 2005). Em função disto, melhorias nos sistemas de cultivo *in vitro* são de fundamental importância para a evolução da técnica.

Atualmente, os meios mais utilizados são estritamente definidos por compostos químicos, com adição de sais minerais, vitaminas e proteínas, além de fontes de energia, tais como glicose, lactato de cálcio, piruvato e aminoácidos (PARK et al., 2013). Mesmo com essas características, os meios não suprem as necessidades requeridas para o ótimo desenvolvimento dos embriões *in vitro*. Assim, um suplemento mais adequado é necessário para suportar as exigências dos embriões *in vitro* e fornecer condições similares ao ambiente *in vivo*. Na tentativa de mimetizar as condições *in vivo*, têm sido utilizados sistemas de co-cultura celular. A aplicação de células somáticas em co-cultura para o apoio no desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* em mamíferos foi aplicada pela primeira vez por Biggers et al., (1962), que cultivou embriões em co-cultura de células de oviduto de rato. Embora os mecanismos pelos quais as células somáticas melhoram o desenvolvimento embrionário não estejam totalmente esclarecidos, o modo de ação dos sistemas de co-cultura se dá através de dois principais mecanismos: um deles é a desintoxicação do meio e o outro é através da disposição de metabolitos e estimuladores de crescimento específicos que essas células podem liberar e, que estão ausentes nos meios convencionais, sem co-cultura (ORSI e REISCHL, 2007).

Células epiteliais de oviduto e fibroblastos embrionárias foram utilizadas em sistema de co-cultura na produção *in vitro* de embriões em diferentes espécies de animais (ORSI e REISCHL, 2007). As células-tronco mesenquimais (MSCs) são uma fonte de células somáticas que podem ser utilizadas em sistema de co-cultura de embriões (HEIDARI et al.,

2013). Essas células são caracterizadas por sua capacidade de se diferenciar em linhagens celulares específicas, já que são multipotentes e têm sido consideradas uma importante fonte de células para aplicação na engenharia de tecidos por muitos anos (KIM et al., 2009). As MSCs também secretam vários fatores bioativos que auxiliam na reparação e regeneração de tecidos lesionados (KIM et al., 2009). Além de secretar fatores de crescimento como MCP-1, VEGF-A, EGF, FGF-2, IL-6, LIF, e TGF- $\beta$ , também secretam uma variedade de citocinas (TIAN et al., 2011). O fibroblasto embrionário de camundongo (MEF) é utilizado em co-cultivo de célula-tronco embrionária e é essencial tanto para o isolamento das células-tronco embrionárias, quanto para sua manutenção *in vitro* (KLIMANSKAYA et al., 2007). Além disso, estimulam o crescimento e permitem que as células-tronco embrionárias mantenham-se indiferenciadas pelo contato direto com o co-cultivo (VILLA-DIAZ et al., 2009).

Assim, MSCs e MEFs, por suas propriedades, como a secreção de fatores bioativos, suporte ao crescimento de outros tipos celulares e facilidade de obtenção, são extremamente atrativas em diversas tecnologias celulares. No presente estudo, investigamos o uso de MSC de rato e MEF de camundongo na co-cultura para otimizar a PIVE, baseado na hipótese de que estas células podem funcionar como uma camada alimentadora, melhorando a eficiência e a qualidade dos embriões.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE)**

Atualmente, o Brasil ocupa uma posição de destaque no cenário mundial, com reconhecimento internacional por sua produção de embriões *in vitro*. É evidente o impacto dessa técnica na produção animal, destacando-se como o principal método para a reprodução de animais economicamente interessantes para o país (GOUVEIA, 2011). A PIVE envolve as etapas de coleta de oócitos, maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) até alcançar o estágio de blastocisto, sendo todas importantes para a qualidade do embrião a ser produzido. Além disso, a menor qualidade dos embriões produzidos *in vitro* limita a sua viabilidade e criopreservação quando comparado com os produzidos *in vivo* (ONGARATTO, 2009). Tais resultados, provavelmente, são consequências de diferenças em diversas características observadas entre os embriões produzidos *in vitro* e os embriões

produzidos *in vivo* (NEVES et al., 2010). A soma de vários aspectos, tais como fatores ambientais, fatores inerentes ao próprio sistema de PIVE e remoção do oócito do ambiente folicular, levam à diminuição na produção de blastocistos quando comparada àquela obtida *in vivo*, já que esses fatores interferem de forma negativa na interação morfológica, hormonal e molecular entre o oócito e as células foliculares, (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Mesmo com a evolução da PIVE nos últimos anos e a sua utilização crescente em programas de melhoramento genético bovino, a percentagem de embriões que se desenvolvem até o estágio de blastocisto é, na maioria das vezes, inferior a 40%, e o índice de gestação também é baixo, em torno de 40% (NEVES et al., 2010).

## **2.2 Maturação oocitária**

O procedimento de cultivo do oócito deve promover um ambiente similar ao folicular e tubário para que a maturação citoplasmática e nuclear ocorra. Neste sentido, a MIV é uma das fases mais importantes da PIVE, pois é nesse período que o oócito adquire capacidade para prosseguir nos próximos eventos (FIV e CIV) (MARTINS et al., 2012). A maturação oocitária envolve mecanismos complexos, dentre os quais muitos não estão totalmente elucidados. Devido a tal fato, a maturação *in vitro* não é totalmente eficiente a ponto de estabelecer um número significativo de oócitos viáveis que suportem o desenvolvimento de um embrião competente (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). No processo da PIVE, a ausência da seleção natural associada a condições não ideais de cultivo, promove uma diminuição na qualidade dos embriões produzidos (BLANCO et al., 2011). Assim, é de fundamental importância focar a atenção nos diversos fatores que são secretados pelo oócito, cujas funções são de controlar aspectos nas atividades das células do cumulus e vice-versa, pois a interação e a regulação recíproca entre oócito e células foliculares são responsáveis pela criação de um microambiente especial e único, capaz de oferecer todas as condições ideais para promover a competência e capacitação do oócito. Dessa forma, através de estudos avançados, pode-se elucidar os mecanismos fisiológicos, bioquímicos e moleculares que estão envolvidos no processo de maturação, os quais poderão contribuir para eficiência do sistema de PIVE (GOTTARDI e MINGOTI, 2009). Em grande parte das espécies de mamíferos, o oócito se desenvolve e amadurece no ambiente folicular. Assim, vários tipos de células são responsáveis pela criação de um ambiente para que isso ocorra. Células da teca, células da

granulosa, células do cumulus e o próprio oócito participam de uma complexa interação de sinalização para controlar o crescimento folicular e a maturação oocitária. O ambiente folicular não é simplesmente um soro, mas sim, um meio modificado especificamente pelas células foliculares, sobretudo para oferecer condições adequadas para a ovulação de um folículo. Dentro deste ambiente, o oócito e as células do cumulus que estão em sua volta, são uma unidade funcional com comunicação dinâmica que ocorre entre cada tipo de célula. O oócito segrega fatores que regulam as funções das células do cumulus e do desenvolvimento folicular, e as células do cumulus liberam moléculas de transporte, que são necessárias para o desenvolvimento e a maturação do oócito, tanto nuclear como citoplasmática (GILCHRIST, 2008). O oócito pode criar um microambiente ótimo dentro do folículo, podendo se desenvolver e atingir competência máxima. Desta forma, a capacidade do oócito para produzir e secretar fatores, bem como a capacidade das células do cumulus de responder adequadamente a esses fatores, contribuem para a formação do oócito competente (KRISHER, 2013). Diante dessa situação, têm sido extensivamente estudados os fatores que estão envolvidos na indução da maturação do oócito após a remoção do mesmo do ambiente folicular, já que a maturação nuclear espontânea do oócito não é suficiente para resultar no desenvolvimento embrionário *in vitro* com a mesma eficiência de embriões *in vivo* (GOTTARDI e MINGOTI, 2009).

#### **2.4 Fecundação *in vitro* (FIV)**

A fecundação, propriamente dita, ocorre no momento em que o espermatozoide capacitado entra em contato com o oócito maduro. Nesse momento, há uma reação em cascata, desencadeada pela passagem do espermatozoide através da membrana pelúcida, penetração na membrana plasmática e alojamento no interior do citoplasma oocitário. Essa fusão envolve o espermatozoide por completo, na qual até mesmo a cauda se integra ao citoplasma. Tal fato é fundamental para que haja a estruturação do citoesqueleto para o primeiro ciclo de divisão celular (GENOVEZ et al., 2010).

## 2.6 Cultivo *in vitro* (CIV)

O CIV é a etapa mais crítica e a mais extensa da produção *in vitro* de embriões, pois nesse momento deve ser estabelecido um ambiente favorável, que é suprido pelo ambiente intra uterino em condições *in vivo* para que o suposto zigoto se diferencie morfológicamente, sem prejudicar suas características fisiológicas e bioquímicas, até alcançar o estágio de blastocisto, sete dias após a fecundação. O embrião, nesse período, sofre uma sequência de divisões mitóticas que leva à compactação dos blastômeros, formando uma mórula compacta e, posteriormente, o desenvolvimento da blastocèle, chegando ao estágio de blastocisto inicial (FREI et al., 1989). Diante da necessidade de um ambiente que proporcione as mesmas características observadas *in vivo*, é necessária a compreensão de diversos fatores de cultivo que influenciam o desenvolvimento *in vitro*, já que estes podem comprometer a produção de embriões por excesso ou falta de algumas substâncias (COELHO et al., 2006).

## 2.7 Meios utilizados

Apesar de modificações em alguns fatores individuais, os sistemas de produção *in vitro* são basicamente compostos por duas soluções definidas: o meio de cultura de tecido 199 (TCM-199: do inglês tissue culture medium) e/ou o Fluido Sintético de Oviduto (SOF). Além dessas duas soluções de base, os laboratórios definem diferentes protocolos, adicionando hormônios, sais, aminoácidos e padronizando a atmosfera gasosa, em prol do bom desenvolvimento, desde a aspiração até a formação de blastocisto (BRANDÃO, 2006).

O meio TCM-199 é composto por substâncias que atendem as necessidades de células somáticas no geral; assim, não possui características específicas para suprir as necessidades do CCOs durante o cultivo de maturação. Diante disso, pesquisadores investigam formulações de suplementos mais específicos para a melhoria da qualidade final dos oócitos (GOTTARDI e MINGOT, 2009). Os principais aditivos utilizados atualmente são: hormônios gonadotrópicos (LH, FSH), uma fonte de proteína, como soro fetal ou albumina, antibióticos (p.ex. penicilina, estreptomicina, gentamicina, etc), podendo ou não ser condicionado em solução de óleo mineral ou óleo de silicone, além da atmosfera controlada em 5% de CO<sub>2</sub> (BRANDÃO, 2006).

Após a maturação, os oócitos e os espermatozoides são mantidos juntos, em meio de Tyrode modificado com albumina, lactato e piruvato, adicionado de antioxidantes (meio FERT-TALP), para que ocorra a fertilização (PARRISH et al., 1986). Finalmente, os oócitos já fecundados (zigotos) são levados ao cultivo que, por sua vez, vem sendo modificado durante os anos. Inicialmente, o sistema mais utilizado era o TCM-199 adicionado de proteínas e antibióticos, associado ao co-cultivo com células somáticas (p.ex. células da granulosa ou do oviduto) e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> em ar atmosférico (THIBODEUX e GODKE, 1992).

O meio denominado Fluido Sintético de Oviduto (SOF) foi disseminado, pois sua composição se assemelha com o ambiente do oviduto. Além disso, são acrescentados aminoácidos essenciais e não essenciais, além de citrato de sódio e mioinositol (SOFaaci). As pesquisas ainda buscam inovações nas condições e formas de cultivo, testando adições de antioxidantes, nutrientes como lactato, piruvato e glicose, proteínas e macromoléculas, com o intuito de tornar o meio mais completo e efetivo (revisado por BRANDÃO, 2006).

## 2.8 Sistemas de cultivo

As necessidades do embrião evoluem e se diferenciam durante o processo de desenvolvimento até a fase de blastocisto. Em vista disso, é difícil atender as exigências dos embriões em cultivo *in vitro*, tornando o período de pré-implantação uma fase delicada, já que as vias metabólicas dos embriões não são totalmente esclarecidas (GUÉRIN e MENÉZO, 2011). Durante o período de pré-implantação ocorre uma sequência de acontecimentos, como ativação do genoma embrionário, divisão celular, compactação dos blastômeros e início da diferenciação celular embrionária que, por sua vez, diferenciará em células do trofoblasto, dando origem à placenta e células do embrioblasto, que dará origem ao feto. Daí a importância de boas condições de cultivo para o bom desenvolvimento embrionário, já que vários fatores intrínsecos e extrínsecos estão envolvidos, o que requer pesquisas para definir melhores protocolos que alcancem a máxima eficiência e qualidade dos embriões produzidos *in vitro* (BAVISTER, 2000).

As condições de cultura devem respeitar vários equilíbrios físicos e químicos, como pH, pressão osmótica, fluxo metabólico de compostos energéticos, suplementos, etc.,

inclusive a regulação autócrina e parácrina que existe durante o desenvolvimento embrionário. Vários sistemas de co-cultura foram identificados e tem sido demonstrado que existe uma complexa relação entre os embriões e as células do co-cultivo. As células co-cultivadas podem provocar alterações contínuas no meio de cultura, eliminando compostos tóxicos e/ou fornecendo fatores embriotróficos, podendo ser benéficas aos embriões (GUÉRIN e MENÉZO, 2011). Em contrapartida, existe o aumento dos riscos associados à transferência de vírus e outros agentes patogênicos subcelulares entre células somáticas e o embrião (THOMPSON, 1997).

Além das condições de cultivo, o número de embriões presentes na gota de cultura também é um fator importante, já que os embriões cultivados em grupo se desenvolvem melhor do que aqueles cultivados individualmente. Isso se deve ao fato de que embriões desenvolvidos em grupo secretam fatores embrionários que irão atuar de forma autócrina e parácrina, estimulando o desenvolvimento dos embriões que estão por sua volta, bem como o seu próprio desenvolvimento (GARDNER, 2000).

Outro método para cultivo de embriões é o de cultura de perfusão, no qual o princípio é que os embriões permaneçam em uma câmara, através da qual o meio pode fluir de forma contínua ou intermitente, proporcionando a vantagem de se alterar a composição do meio sem nenhuma perturbação e efeito do ambiente externo aos embriões (TROMPSON e PETERSON, 2000).

## **2.9 Co-cultura**

Atualmente, tem se utilizado co-cultura de células somáticas da granulosa ou células do cumulus do próprio oócito em sistema de cultivo *in vitro* de embriões, com o objetivo de favorecer o desenvolvimento dos zigotos até a fase de blastocisto. Além do co-cultivo, adiciona-se também uma fonte de proteína, como soro fetal bovino ou albumina sérica, para melhorar o crescimento do embrião. Apesar dos diversos avanços em busca de um meio de cultivo mais eficiente, este ainda precisa ser melhorado. O sistema de cultura ideal seria um sistema definido, caracterizado por não utilizar co-cultura de células ou soros. Dessa forma, é possível obter um melhor controle das condições de cultivo e quantificar exatamente os compostos ali adicionados (Revisado por CAMARGO et al., 2001).

Uma alternativa para a co-cultura são as CT, capazes de secretar fatores bioativos (UCCELLI et al., 2008) que têm papel na indução da proliferação celular (CHENG e YAU, 2008).

## **2.10 Células-tronco**

As CT são células indiferenciadas, com capacidade de auto-renovação; ou seja, originar outra CT com características idênticas e com habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular (VERFAILLIE, 2002).

As CT podem ser classificadas, segundo sua potencialidade de diferenciação, em: totipotentes, pluripotentes ou multipotentes. São chamadas de totipotentes as células capazes de gerar todas as células do organismo, incluindo as células que sustentam o desenvolvimento do embrião no útero; são encontradas no zigoto e nos blastômeros embrionários no estágio inicial de desenvolvimento, até o estágio de 4-células pelo menos. As células pluripotentes podem originar todas as células que formam o embrião propriamente dito e são provenientes da massa celular interna do blastocisto, diferenciando-se em células dos três folhetos germinativos: endoderma, ectoderma e mesoderma. Estas células são incapazes de formar um organismo completo, pois não conseguem gerar tecidos extra-embrionários. As células multipotentes são capazes de se diferenciar em um número limitado de tipos celulares, em geral, restrito ao tecido de origem (revisado por MITALIPOV e WOLF, 2009). As células-tronco do adulto, ou somáticas, têm sido identificadas dentro de nichos específicos na maioria dos tecidos, tais como as neurais, cardíacas, derivadas da medula óssea, dentre muitas outras (MIMEAULT et al., 2007). Além das propriedades e capacidade de diferenciação, podem-se dividir as fontes de CT em três classes: embrionária, fetal e adulta. As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto no estágio inicial de desenvolvimento e podem ser expandidas em cultura por longo período, na presença de fatores que bloqueiam sua diferenciação (GAGE, 2000). A fonte mais utilizada para extração das células-tronco adulta é a medula óssea, onde se encontram dois tipos de CT: as hematopoiéticas e as mesenquimais. Além da medula óssea, as CT mesenquimais podem também ser encontradas em vários outros tecidos, como sangue periférico, tecido adiposo, sangue de cordão umbilical, entre outros (BONILLA et al., 2005). As CT fetais podem ser

isoladas de qualquer tecido, desde que a extração ocorra durante a formação destes tecidos no período fetal (SCHWINDT et al., 2005).

### **2.11 Célula-tronco Mesenquimal (MSC)**

A presença de células-tronco na medula óssea foi sugerida pela primeira vez por observações do patologista alemão Cohnheim, há 130 anos. O seu trabalho levantou a possibilidade de que a medula óssea poderia ser fonte de fibroblastos e que as fibras de colágeno fariam parte do processo normal de cicatrização de feridas (PROCKOP, 1997).

A partir do trabalho de Friedenstein e colaboradores, ficou evidente que a medula óssea contém células que podem se diferenciar em outras células. Células íntegras da medula foram colocadas em placas de cultura. As células não aderentes foram removidas, eliminando, assim, a maior parte das células hematopoiéticas. A partir daí, identificou-se a formação de colônias. Cada colônia foi denominada de unidade formadora de colônia fibroblástica. Foi relatado que as células aderentes eram heterogêneas na aparência, mas as células que melhor aderiram eram fusiformes e formavam colônias de 2 a 4 células, permaneciam inativas por 2 a 4 dias e, em seguida, começavam a multiplicar-se rapidamente. Após várias passagens em cultura, as células fibroblásticas aderentes tornaram-se mais homogêneas na aparência. Também se descobriu que as células poderiam se diferenciar em colônias que lembravam pequenos depósitos de osso ou cartilagem. Estabeleceu-se, então, que as células isoladas pelo método de Friedenstein eram multipotentes, diferenciando-se em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e, até mesmo, em mioblastos (FRIEDENSTEIN et al., 1976). Atualmente, a progênie da colônia de fibroblastos é denominada de célula mesenquimal, devido à sua capacidade de se diferenciar em células do tipo mesenquimal ou em células do estroma da medula, já que ambas parecem surgir a partir do complexo da matriz estrutural, que se encontra na medula óssea (PROCKOP, 1997).

As MSCs são células estromais pertencentes a uma população heterogênea de células aderentes ao plástico. Em cultura, são capazes de auto-renovação e diferenciação em tecidos como osso, cartilagem, músculo, ligamento, tendão e tecido adiposo, além de contribuir para a regeneração desses tecidos (HORWITZ et al., 2005). As MSCs representam uma população pequena na medula óssea quando comparadas com o conteúdo total de células nucleadas da

mesma, representando cerca de 1 em cada 100.000 células, o que as tornam células raras. Mesmo sendo mortais, elas possuem a capacidade de expandir muitas vezes em cultura, mantendo o seu crescimento e potencial de multilinhagens (CAPLAN, 2007) e propriedades que as tornam excelentes candidatas para a engenharia de tecidos. Estudos clínicos e pré-clínicos demonstram que as MSCs, quando transplantadas sistemicamente, são capazes de migrar para locais de lesões, sugerindo que possuem capacidade migratória e tropismo para áreas lesionadas devido à expressão de vários receptores de quimiocinas e moléculas de adesão. As MSCs têm sido tradicionalmente isoladas a partir da medula óssea, mas estas células também podem ser isoladas a partir de uma variedade de tecidos, como tecido adiposo, sangue de cordão umbilical, fígado fetal, sangue e pulmão. Estas extrações celulares não possuem problemas relacionados a questões éticas e legais (CHAMBERLAIN et al., 2007).

Tem sido mostrado que as MSCs possuem uma plasticidade e um potencial de regeneração mais amplo do que outras células-tronco adultas, pois, apesar de residirem em nichos especializados nos tecidos, sua localização perivascular permite que tenham acesso global e, quando migram para um tecido lesado, podem secretar grandes quantidades de fatores bioativos que são imunoregulatórios e tróficos (CAPLAN, 2009), como TGF $\beta$ 1, HGF, IL-10, PGE2, IL-6, VEGF e IGF-I entre outros (UCCELLI et al., 2008). Além disso, estes fatores induzem à proliferação (CHENG e YAU, 2008) e manutenção do estado indiferenciado de células-tronco da medula óssea (GRONTHOS e SIMMONS, 1996).

Dependendo da fonte das células-tronco, pode ser observada a expressão de diferentes quantidades e tipos de fatores. De acordo com Lange-Consiglio et al. (2012) um fator de crescimento que diferencia as células-tronco epitelial amniótica de equinos das células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de equinos é o EGF, que é produzido in vivo por células endometriais e para os quais o embrião possui receptores. Mesmo não podendo afirmar que este fator é responsável pelos diferentes resultados em cultura in vitro utilizando embrião bovino, Lange-Consiglio et al. (2012) acredita que certamente é um dos principais candidatos a desempenhar um papel positivo da monocamada de células-tronco epitelial amniótica de equinos no desenvolvimento embrionário bovino, assim como ocorre in vivo com a presença positiva do endométrio. Em contrapartida, em estudo com ovinos, Heidari et al., (2013) concluiu que o desenvolvimento de embriões foi melhor suportado em sistema de cultura isento de células quando comparados com sistema de co-cultura em células-tronco

mesenquimais ou células epiteliais de oviduto, que foi utilizado numa tentativa de reproduzir com a maior semelhança possível as condições *in vivo*. No entanto, apesar da aplicação do sistema de co-cultura com células-tronco mesenquimais nos primeiros 3 dias de cultura não ter melhorado a taxa de blastocistos em comparação com os demais grupos, incluindo o livre de células no sistema de cultivo, a taxa de eclosão no dia 8 de cultivo do grupo co-cultivado com células mesenquimais foi superior aos grupos controle ou células epiteliais de oviduto.

A ampla variedade de tecidos, fontes de MSCs, as quais são isoladas em conjunto com diferentes condições de cultura, provoca uma falta de consenso sobre o fenótipo de MSCs. Além disso, as diferenças nas formulações de meios utilizados para a cultura das células, a densidade de plaqueamento e a tensão de oxigênio podem afetar o fenótipo da população de MSCs em relação à sua origem e linhagem (D'IPPOLITO et al., 2004). Nessa situação, fica claro o risco de que as células usadas para fins experimentais na cultura *in vitro* de embriões sejam derivadas de populações não homogêneas de células-tronco mesenquimais, sendo necessária a averiguação de suas características (POTAPOVA et al., 2007). Também é importante salientar que o desenvolvimento embrionário não necessita de que as células utilizadas em co-cultura sejam da mesma espécie animal que os embriões (LANGE-CONSIGLIO et al., 2012).

## **2.12 Fibroblasto embrionário murino (MEF)**

O fibroblasto embrionário de camundongo (MEF, do inglês mouse embryonic fibroblasts) é obtido de fetos de camundongo e, normalmente, é utilizado em co-cultivo de célula-tronco embrionária. As células da massa celular interna do embrião são cultivadas, em geral, sobre uma monocamada de MEF mitoticamente inativadas (iMEF), sendo essenciais tanto para o isolamento das células-tronco embrionárias, quanto para sua manutenção *in vitro* (KLIMANSKAYA et al., 2007). O MEF secreta componentes da matriz extracelular e principalmente fatores de crescimento, o que permite que as células-tronco embrionárias mantenham-se indiferenciadas pelo contato direto com o co-cultivo, além de estimular seu crescimento (VILLA-DIAZ et al., 2009).

A influência de co-cultura com células de fibroblastos fetais foi estudada por Li et al. (2001) sobre a maturação *in vitro* de oócitos equinos e por Hatoya et al. (2006) sobre a

maturação, fertilização e cultivo *in vitro* de oócitos caninos. Nesses estudos, foram encontradas taxas superiores de blastocistos que foram produzidos a partir de co-cultura de células de fibroblastos fetais em relação ao grupo em que os oócitos foram cultivados em condição controle, demonstrando uma influência benéfica da co-cultura com fibroblastos fetais para a maturação nuclear e citoplasmática de oócitos *in vitro*. Estas células de fibroblastos fetais podem secretar várias citocinas e fatores de crescimento que afetam positivamente na maturação meiótica dos oócitos *in vitro* (HATOYA et al., 2006).

Dados prévios do nosso grupo mostraram que, tanto a MSC, como a MEF aumentam a quantidade e a qualidade de embriões cultivados *in vitro* no modelo murino. Assim, com base nas informações apresentadas, o presente estudo investigou o efeito da utilização de MSCs ou MEF como fonte alimentadora, no intuito de apoiar o desenvolvimento embrionário *in vitro*, empregando embriões bovinos como modelo experimental).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Investigar o efeito da co-cultura de MSC ou MEF como fonte alimentadora na produção *in vitro* de embriões bovinos.

#### **3.2 Específico**

- Avaliar a taxa de produção e desenvolvimento embrionário *in vitro* de embriões co-cultivados com MSC ou MEF durante a maturação e/ou cultivo;
- Analisar a taxa de maturação e apoptose dos oócitos cultivados em condição controle ou monocamada de células;
- Analisar o número de células do epiblasto e trofoblasto, a taxa de proliferação e morte celular dos embriões cultivados em condição controle ou monocamada de células;

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAVISTER, B. D. Interactions between embryos and the culture milieu. **Theriogenology**, Madison, WI USA , v. 53, n. 2, p. 619-626, jan. 2000.

BIGGERS, J. D.; GWATKIN, R. B.; BRINSTER, R. L. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. **Nauchni Trudove na Visshia Meditsinski Institut**, Sofiia, n. 194, p. 747–749, maio 1962.

BLANCO, M. R. et al. Developmental competence of in vivo and in vitro matured oocytes: a review. **Biotechnology and Molecular Biology Review**, Cordoba, v. 6, n 7., p. 155-165, set. 2011.

BONILLA, S. et al. Functional neural stem cells derived from adult bone marrow. **Neuroscience**, Valencia, v. 133, n. 1, p. 85-95, abr. 2005.

BRANDÃO, D. O. **Produção in vitro de embriões**: cultivo de embriões pós-eclosão e criopreservação de meios prontos para uso. [s.l.: s.n.], 2006.

CAMARGO, L. S. A. et al. Efeito de sistema de cultivo, célula somática e soro em co-cultura sobre o desenvolvimento de embriões bovinos fecundados in vitro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 53, n. 1, p. 78-83, fev. 2001.

CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. **J Cell Physiol**, v. 213 , n.2, p. 341-347, nov. 2007.

CAPLAN, A. I. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of pathology**, Gran Bretanha, v. 217, n. 2, p. 18-24, jan. 2009.

CHAMBERLAIN, G. et al. Concise review mesenchymal stem cells their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. **Stem cells**, v. 25, n. 11, p. 273-274, nov. 2007.

CHENG, A. S.; YAU, T. M. Paracrine effects of cell transplantation: strategies to augment the efficacy of cell therapies. **Seminars in thoracic and cardiovascular surgery**, v. 20, n. 2, p. 94-101, jul. 2008.

COELHO, E. R. et al. Metabolismo embrionário no período de pré- implantação. **Femina**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 8, p. 551-557 , ago. 2006. ISSN 551-557.

D'IPPOLITO, G. et al. Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. **J Cell**, v. 117, n. 14, p. 2971-81, jun. 2004.

- FRIEDENSTEIN, A. J.; GORSKAJA, J. F.; KULAGINA, N. N. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. **Exp Hematol**, v. 4, n. 4, p. 267–27, set.1976.
- GAGE, F. H. Mammalian neural stem cells. **Science**, Washington, v. 287, n. 5457, p. 1433-1438, fev. 2000.
- GARDNER, D. K. A Embryo culture system. In: TROUNSON.O.; GARNER, D.K, ed. **Handbook of in vitro fertilization**. 2. ed. Boca Raion: CRC Press, 2000.
- GENOVEZ, M. E.; PINHEIRO, E. S.; , C. A. F. Agentes microbianos associados ao trato genital de touros. **Centro de P&D de Sanidade Animal**, v. 143,n. 143, p. 403-405, out. 2010.
- GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Hum. Reprod.**, Adelaide, v. 14, n. 2, p. 59–77, jan. 2008.
- GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, Jaboticabal, v. 33, n. 2, p. 82-94, abr./jun. 2009.
- GOUVEIA, F. F. **A produção in vitro de embriões bovinos**. [S.l.: s.n.], 2011.
- GRONTHOS, S.; SIMMONS, P. J. The biology and application of human bone marrow stromal cell precursors. **Journal of hematotherapy**, v. 5, n. 1, p. 15-23, fev.1996.
- GUERIN, P.; MENEZO, Y. Review: Role of tubal environment in preimplantation embryogenesis: application to co-culture assays. **Zygote**, Cambridge, v. 19, n. 1, p. 47-54, fev. 2011.
- HATOYA, S. et al. Effect of co-culturing with embryonic fibroblasts on IVM, IVF and IVC of canine oocytes. **Theriogenology**, Sakai, v. 66, n. 10, p. 599-8531, abr. 2006.
- HEIDARI, B. et al. Effect of various co-culture systems on embryo development in ovine. **Czech J. Anim. Sci.**, Tehran, v. 10, n. 58, p. 443–452, out. 2013.
- HORWITZ, E. M. et al. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, Tennessee, v. 7, n. 5, p. 393-395,2005.
- IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE**: estatística de Produção Pecuária. [S.l.], 2014. p.49.
- KIM, W. S.; PARK, B. S.; SUNG, J. H. Protective role of adiposederived stem cells and their soluble factors in photoaging. **Arch Dermatol**, Seul, v. 301, n. 5, p. 329-36, jun. 2009.
- KLIMANSKAYA, I. et al. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. **Nat Protoc**, v. 2, n. 8, p. 63-72, ago. 2007.

KRISHER, R. L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annu. Rev. Anim. Biosci.**, Colorado, v. 1, n. 1, p. 393-417, jan. 2013.

LANGE-CONSIGLIO, A. et al. Equine bone marrow mesenchymal or amniotic epithelial stem cells as feeder in a model for the in vitro culture of bovine embryos. **Zygote**, Lodi, v. 20, n. 1, p. 45-51, fev. 2012.

MARTINS, J.; ALICIO, C. S.; SANCHES, R. Desenvolvimento de embriões após maturação in vitro de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. **Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 89-100, mar. 2009.

MIMEAULT, M.; HAUKE, R.; BATRA, S. K. Stem Cells: A revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications in regenerative medicine and cancer therapies. **Clinical pharmacology and therapeutics**, Nebraska, v. 82, n. 3, p. 2, ago. 2007.

MITALIPOV, S.; WOLF, D. Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, Berlin, v. 114, p. 85-99, mar. 2009.

NEVES, J. P.; KARINA, L. M.; RODRIGO, D. T. Progresso científico em reprodução na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, p. 414-421, 2010.

ONGARATTO, F. L. **Criopreservação de embriões bovinos**. [S.l.: s.n.], 2009.

ORSI, N. M.; REISCHL, J. B. Mammalian embryo co-culture: trials and tribulations of a misunderstood method. **Theriogenology**, Leeds, v. 67, n. 3, p. 441-458, nov. 2007.

PARK, H. Y. . K. E. Y.; LEE, S. E.; CHOI, H. Y. Effect of human adipose tissue-derived mesenchymal-stem-cell bioactive. **Mol Reprod Dev.**, Jeju, v. 80, n. 20, p. 35-47, nov. 2013.

PARRISH, J. J. et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, Wisconsin, v. 25, n. 4, p. 591-600, fev. 1986.

POMAR, F. J. et al. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: A comparative study. **Theriogenology**, Yalelaan, v. 63, n. 8, p. 2254-2268, out. 2004.

POTAPOVA, I. A. et al. Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. **Stem Cells**, New York, v. 25, n. 7, p. 1761-1768, mar. 2007.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science**, Washington, v. 276, n. 5309, p. 71-74, abr. 1997.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar Perspectivas de destino das células-tronco. **J Bras Neurocirurg**, v. 16, n. 1, p. 9-13, jan/abr. 2005

THIBODEAUX, J. K.; GODKE, R. A. In vitro enhancement of early-stage embryos with co\*culture. **Arch.Pathol.Lab.Med.**, v. 116, p. 364-371, 1992.

THOMPSON, J. G. Comparison between in vivo derived and in vitro produced pre-elongation embryos from domestic ruminants. **Reprod. Fertil. Dev.**, Hamilton, v. 9, n. 3, p. 341-354, 1997.

THOMPSON, J. G.; PETERSON, A. J. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. **Human Reproduction**, Hamilton, v. 15, n. 5, p. 59-67, dez. 2000. Suplemento.

TIAN, L. L. et al. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. **Journal of Cellular Physiology**, Jinan, v. 226, n. 7, p. 1860–1867, jul. 2011.

UCCELLI, A.; MORETTA, L.; PISTOIA, V. Mesenchymal stem cells in health and disease. **Nat Rev Immunol**, Genoa, v. 8, n. 9, p. 26-36, set. 2008.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends Cell Biol**, Minneapolis, v. 12, n. 11, p. 8, nov. 2002.

VILLA-DIAZ, L. G. et al. Analysis of the factors that limit the ability of feeder cells to maintain the undifferentiated state of human embryonic stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 18, n. 4, p. 41-51, set. 2008.

## 5. CAPÍTULO 1: Manuscrito a ser enviado à revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.

### **Desenvolvimento *in vitro* de embriões bovinos usando células-tronco mesenquimais de rato e fibroblastos embrionárias de camundongos**

Sávio Carneiro Martins(1); Luiz Sérgio de Almeida Camargo(1); Jasmin(1,2)

University of Alfenas, UNIFENAS – Alfenas – MG, Brazil.

Alfenas – MG, Brasil.

e-mail: [luiz.camargo@embrapa.br](mailto:luiz.camargo@embrapa.br)

**Resumo** - Este estudo tem como objetivo investigar o efeito da co-cultura de MSC de medula óssea de rato ou MEF como fonte alimentadora na produção *in vitro* de embriões bovinos. (CCO) foram maturados em três grupos distintos: Controle (CTRL), co-cultura com monocamada de células mesenquimais de ratos (MSC) e co-cultura com monocamada de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF). A fecundação foi realizada em controle para todos os grupos e os embriões fecundados *in vitro* foram cultivados a partir do quarto dia em CTRL, MSC ou MEF. Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre os oócitos dos grupos CTRL, MSC e MEF, na taxa de estruturas em metáfase II, apoptose e clivagem. O número de células da massa celular interna, células do trofoblasto, células em apoptose e células totais foram iguais ( $P>0,05$ ) entre os embriões dos diferentes grupos experimentais. No oitavo dia de cultivo embrionário houve diferença ( $P<0,05$ ) da taxa de blastocisto eclodido, sendo maior no grupo CTRL/CTRL quando comparado ao grupo MSC/MSC; no entanto, a proporção de blastocisto, blastocisto expandido e blastocistos totais não foram diferentes ( $P>0,05$ ) entre os grupos experimentais. Não houve melhora significativa no desenvolvimento embrionário bovino utilizando co-culturas com MSC ou MEF, quando comparado com sistema de cultura controle.

Palavras-chave: PIV de Embriões bovinos, camada de alimentação, células-tronco mesenquimais, fibroblastos embrionário de camundongo.

### **Development in vitro embryos cattle using stem cells and rat mesenchymal fibroblasts of embryonic mice**

Abstract – This study aims to investigate the effect of co-culture of MSC from rat bone marrow or MEF as feeder source in the *in vitro* production of bovine embryos. (OCC) were matured into three groups: Control (CTRL) co-cultured with mesenchymal cells monolayer rats (MSC) and co-cultured with a monolayer of mouse embryonic fibroblasts (MEF). Fertilization was performed in control for all groups and in vitro fertilized embryos were cultured from the fourth day in CTRL, MSC or MEF. No significant difference was found between the oocytes of CTRL groups, MSC and MEF, the fee structures in metaphase II, apoptosis and cleavage. The number of cells of the inner cell mass, trophoblast cells, apoptotic cells and total cells were similar ( $P > 0.05$ ) between embryos of different experimental groups. On the eighth day of embryo culture difference ( $P < 0.05$ ) in hatched blastocyst rate was higher in the CTRL / CTRL group compared to the group MSC / MSC; however, the proportion of blastocyst, expanded blastocyst and blastocyst totals were not different ( $P > .05$ ) among experimental groups. There was no significant improvement in using bovine embryo cocultures with or MEF MSC compared to control culture system.

Key words: PIV Bovine embryos, feeder layer, mesenchymal stem cells, embryonic mouse fibroblasts.

## Introdução

O Brasil possui aproximadamente 211 milhões de bovinos, sendo assim, o maior rebanho comercial do mundo (IBGE, 2014). As biotécnicas reprodutivas têm assumido papel importante na melhoria do rebanho nacional. Dentre as biotécnicas aplicadas à reprodução de bovinos no Brasil, destaca-se a produção de embriões *in vivo* e *in vitro* por sua capacidade de multiplicação de descendentes e de redução do intervalo entre gerações, contribuindo para acelerar o ganho genético. No entanto, os embriões produzidos em sistema *in vitro* não se desenvolvem bem, quando comparados aos embriões obtidos a partir de fontes *in vivo*. As diferenças na produção de blastocisto de alta qualidade se dão principalmente pelas condições sub ideais que o ambiente de cultura *in vitro* oferece (POMAR et al., 2005). Em função disto, melhorias nos sistemas de cultivo *in vitro* são de fundamental importância para a evolução da técnica.

Atualmente, os meios mais utilizados são estritamente definidos por compostos químicos, com adição de sais minerais, vitaminas e proteínas, além de fontes de energia, tais como glicose, lactato de cálcio, piruvato, e aminoácidos (PARK et al., 2013). Mesmo com essas características, os meios não suprem as necessidades requeridas para o ótimo desenvolvimento dos embriões *in vitro*. Assim, um suplemento mais adequado é necessário para suportar as exigências dos embriões *in vitro* e fornecer condições similares ao ambiente *in vivo*. Na tentativa de mimetizar as condições *in vivo*, têm sido utilizados sistemas de co-cultura celular. A aplicação de células somáticas em co-cultura para o apoio no desenvolvimento de embriões produzidos *in vitro* em mamíferos foi aplicada pela primeira vez por Biggers et al., (1962), que cultivou embriões em co-cultura de células de oviduto de rato. Embora os mecanismos pelos quais as células somáticas melhoram o desenvolvimento

embrionário não estejam totalmente esclarecidos, o modo de ação dos sistemas de co-cultura se dá através de dois principais mecanismos: um deles é a desintoxicação do meio e o outro é através da disposição de metabolitos e estimuladores de crescimento específicos que essas células podem liberar e, que estão ausentes nos meios convencionais, sem co-cultura (ORSI e REISCHL, 2007).

Células epiteliais de oviduto e fibroblastos embrionárias foram utilizadas em sistema de co-cultura na produção *in vitro* de embriões em diferentes espécies de animais (ORSI e REISCHL, 2007). As células-tronco mesenquimais (MSCs) são uma fonte de células somáticas que podem ser utilizadas em sistema de co-cultura de embriões (HEIDARI et al., 2013). Essas células são caracterizadas por sua capacidade de se diferenciar em linhagens celulares específicas, já que são multipotentes e têm sido consideradas uma importante fonte de células para aplicação na engenharia de tecidos por muitos anos (KIM et al., 2009). As MSCs também secretam vários fatores bioativos que auxiliam na reparação e regeneração de tecidos lesionados (KIM et al., 2009). Além de secretar fatores de crescimento como MCP-1, VEGF-A, EGF, FGF-2, IL-6, LIF, e TGF- $\beta$ , também secretam uma variedade de citocinas (TIAN et al., 2011). O fibroblasto embrionário de camundongo (MEF) é utilizado em co-cultivo de célula-tronco embrionária e é essencial tanto para o isolamento das células-tronco embrionárias, quanto para sua manutenção *in vitro* (KLIMANSKAYA et al., 2007). Além disso, estimulam o crescimento e permitem que as células-tronco embrionárias mantenham-se indiferenciadas pelo contato direto com o co-cultivo (VILLA-DIAZ et al., 2009).

Assim, MSCs e MEFs, por suas propriedades, como a secreção de fatores bioativos, suporte ao crescimento de outros tipos celulares e facilidade de obtenção, são extremamente atrativas em diversas tecnologias celulares. No presente estudo, investigamos o uso de MSC de rato e MEF de camundongo na co-cultura para otimizar a PIVE, baseado na hipótese de

que estas células podem funcionar como uma camada alimentadora, melhorando a eficiência e a qualidade dos embriões.

### **Material e Métodos**

Os experimentos de PIVE foram realizados na Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora – MG.

Os ovários foram coletados no frigorífico Fripai Distribuidora de Carnes em Juiz de Fora – MG. Ovários de vacas e novilhas mestiças foram coletados logo após o abate e evisceração dos animais e transportados até o laboratório em frascos com solução fisiológica (0,9% NaCl) contendo antibiótico (0,05 g/litro de sulfato de estreptomicina), a uma temperatura entre 30 e 35°C, em um período de até quatro horas após a coleta. No laboratório, os folículos com diâmetro entre 3 e 8mm foram puncionados e aspirados com auxílio de agulha 18g e seringa de 10 ml e o conteúdo foi depositado em um tubo cônico mantido sob aquecimento em banho-maria a 37°C. Após 15 minutos para decantação, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi lavado com meio TALP HEPES e depositado em uma placa de Petri quadriculada para procura dos complexos células do cumulus-oócito (CCOs).

CCOs foram maturados em três grupos distintos: Controle (CTRL), co-cultura com monocamada de células mesenquimais de ratos (MSC) e co-cultura com monocamada de fibroblastos embrionários de camundongos (MEF). Após fecundação em condição idêntica para todos os grupos, os embriões fecundados foram também cultivados em CTRL, co-cultura com MSC ou co-cultura com MEF, totalizando 7 grupos experimentais, conforme a descrição abaixo:

- CTRL/CTRL – maturação e cultivo embrionário em condições de controle (CTRL);
- CTRL/MSC – maturação em CTRL e cultivo embrionário em MSC a partir do quarto (4º) dia após o início do cultivo embrionário *in vitro*;
- CTRL/MEF – maturação em CTRL e cultivo embrionário em MEF a partir do quarto (4º) dia após o início do cultivo embrionário *in vitro*;
- MSC/CTRL – maturação em MSC e cultivo embrionário em CTRL;
- MSC/MSC – maturação e cultivo embrionário em MSC a partir do quarto (4º) dia após o início do cultivo embrionário *in vitro*;
- MEF/CTRL – maturação em MEF e cultivo embrionário em CTRL
- MEF/MEF – maturação e cultivo embrionário em MEF a partir do quarto (4º) dia após o início do cultivo embrionário *in vitro*;

Foram analisadas a maturação e a apoptose em oócitos ao final da MIV em CTRL, MSC e MEF. Em todos os grupos foram analisados o desenvolvimento embrionário (proporção de clivagem, degeneração, blastocistos, blastocistos expandidos, blastocistos eclodidos e blastocistos totais), número total de células, número de células da massa celular interna e do trofoblasto e a apoptose em blastocistos.

### **Análise estatística**

A significância estatística foi avaliada através do teste de qui-quadrado para oócitos e Kruskal-Wallis não paramétrico com pós-teste de Dunn usando GraphPad Prism 5 (GraphPad

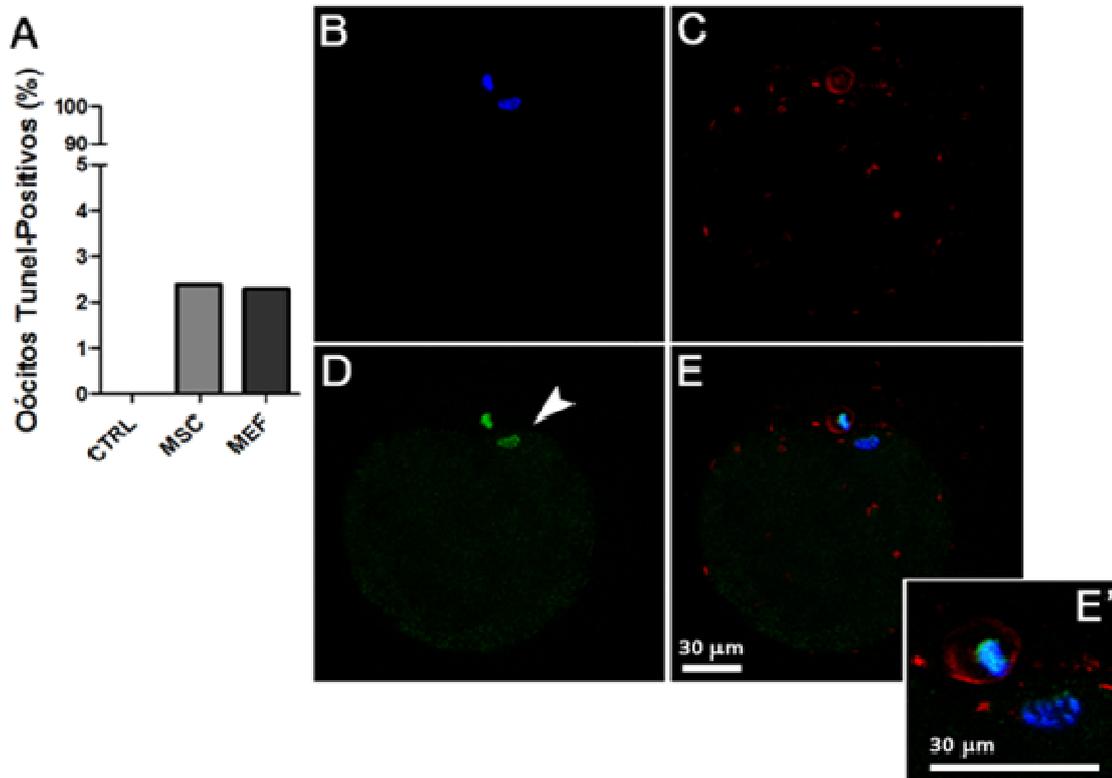
Software, San Diego, CA) para embriões, no qual  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os dados são apresentados como média e as barras de erro representam o erro padrão da média.

### **Resultados e Discussões**

A produção e qualidade dos embriões por sistema de cultivo *in vitro* sofrem grandes influências do ambiente utilizado, tanto na MIV como na CIV. A procura de condições mais adequadas, que possam mimetizar o ambiente do oviduto e útero, tem sido constante e é considerada crucial para a produção de um embrião de melhor qualidade (GOTTARDI e MINGOTI, 2009), mais similar ao produzido *in vivo*. Este estudo investigou o papel de células MSC e MEF na co-cultura durante a MIV e/ou CIV como alternativa de suporte para a maturação oocitária e desenvolvimento embrionário. A eficiência das co-culturas na MIV e CIV sobre o desenvolvimento e qualidade de embriões foram avaliadas pela comparação entre os grupos das taxas de maturação e apoptose oocitária, clivagem no dia 4, taxa de embriões em estágio de blastocisto, de blastocisto expandido, de blastocisto eclodido nos dias 7 e 8 e taxa total de blastocisto. Além disso, avaliamos o número total de células, apoptose, bem como a relação entre massa celular interna (ICM) e células do trofoblasto através de imunorreações nos blastocistos produzidos no dia 8 após a fecundação *in vitro*.

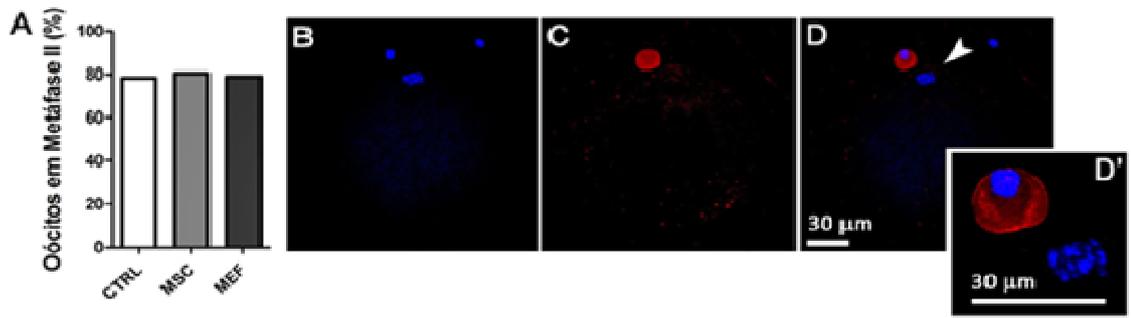
Oócitos co-cultivados em CTRL, MSC e MEF foram fixados após a MIV e a proporção de estruturas oocitária em metáfase II e em apoptose (TUNEL+) foram avaliadas através do teste qui-quadrado. A taxa de oócitos em metáfase II e oócitos TUNEL+ foram semelhantes ( $P > 0,05$ ) entre os grupos CTRL, MSC e MEF (Figura 1 e 2), mostrando que a co-cultura com esses tipos de células provenientes de ratos e camundongos na MIV de bovinos não influencia o processo de maturação e nem na apoptose dos oócitos bovinos. As

Figuras 1 e 2 mostram imagens representativas de oócitos em metáfase II e em apoptose obtidas neste estudo.



**Figura 1:** Proporção de oócitos em apoptose (TUNEL-positivos) após maturação *in vitro* sem co-cultura (CTRL), co-cultura com células mesenquimais de ratos (MSC) ou com fibroblastos embrionários de camundongos (MEF)

(A) Quantificação da percentagem de oócitos TUNEL-positivos. (B-E') Imagens representativas de microscopia confocal, mostrando o oócito positivo para TUNEL em metáfase II, sendo (B) os núcleos do oócito e do corpúsculo polar marcados em DAPI (círculo branco delimitando a área do oócito), (C)  $\alpha$ -tubulina, (D) marcação de TUNEL (seta indica o núcleo do oócito marcado), (E) a sobreposição das imagens e (E') o maior aumento dos núcleos do oócito e do corpúsculo polar mostrados em (E). Barra de escala= 30  $\mu$ m.  $P > 0,05$ .



**Figura 2:** Avaliação do estágio de maturação de oócitos cultivados em diferentes condições experimentais.

(A) Quantificação da porcentagem de oócitos em metáfase II. (B-D') Imagens representativas de microscopia confocal mostrando o oócito em metáfase II, sendo (B) os núcleos do oócito e do corpúsculo polar marcados em DAPI (círculo branco delimitando a área do oócito), (C)  $\alpha$ -tubulina, (D) a sobreposição das imagens e (D') o maior aumento dos núcleos do oócito e do corpúsculo polar mostrados em (D), a seta mostra a placa metafásica do oócito. Barra de escala= 30  $\mu$ m. Abreviaturas Grupo: condição Controle (CTRL), n = 39; co-cultivadas com células mesenquimais (MSC), n = 43; co-cultivados com fibroblastos (MEF), n = 41.  $P > 0,05$ .

O processo de maturação inclui todos os eventos que permitem ao oócito expressar seu potencial máximo de desenvolvimento após a fecundação, adquirindo capacidade para prosseguir nos próximos eventos (FIV e CIV) (MARTINS et al., 2012). Oócitos com maturação nuclear e citoplasmática adequadas são mais competentes em se tornar um embrião após a fecundação *in vitro*, pois muitas das proteínas e transcritos armazenados em seu citoplasma serão necessárias para o futuro embrião a ser formado (KRISHER, 2013). Portanto, a competência do oócito somente pode ser avaliada após a sua fecundação e capacidade do zigoto gerado em se tornar um embrião.

A clivagem foi avaliada no dia 4 após o início do cultivo embrionário (4 dias após a FIV), antes dos embriões serem transferidos para os grupos experimentais com co-cultura na CIV. Portanto, os dados mostram somente os efeitos da co-cultura dos oócitos com MSC e MEF durante a MIV sobre a taxa de clivagem.

Nenhuma diferença significativa entre os grupos CTRL, MSC e MEF foi observada nas taxas de clivagem no dia 4 (Tabela 1). Este período de desenvolvimento possui grande dependência das proteínas e transcritos estocados no citoplasma do oócito durante seu crescimento e maturação (KRISHER, 2013). Portanto, a maturação em MSC e MEF, além de não influenciar a taxa de maturação e apoptose em oócitos, também não possui efeito na taxa de clivagem dos embriões. A utilização de MSC ou MEF em co-cultura pode propiciar efeitos embriotróficos, já que essas células produzem alguns fatores bioativos que poderiam melhorar a maturação meiótica e o desenvolvimento subsequente de embriões produzidos *in vitro* (LING et al., 2008). Desse modo, apesar de não haver influência na proporção de metáfase II e apoptose, ainda é necessário avaliar os efeitos nos eventos posteriores, relacionados ao desenvolvimento embrionário.

Apesar da qualidade do oócito ser vista como um fator chave, que determina a proporção de oócitos desenvolvidos até o estágio de blastocisto e a incrível tolerância de embriões de mamíferos se desenvolverem no ambiente em que são cultivadas, há relatos na literatura sugerindo que o período de pós fertilização do cultivo embrionário é o mais crítico, afetando diretamente a qualidade dos blastocistos e a eficiência da implantação (HEIDARI et al., 2013). É bem conhecido que os embriões produzidos *in vitro* têm uma qualidade inferior quando comparados aos produzidos *in vivo*. Essa diferença tem sido relacionada a diversos aspectos, incluindo anormalidades genéticas intrínsecas, danos durante a coleta e manipulações dos gametas. No entanto, as condições de cultura são também um parâmetro

importante, que pode e deve ser cuidadosamente retrabalhado, até que se encontre uma metodologia ideal para o bom desenvolvimento embrionário (GELBER et al., 2011). As condições de cultura inadequadas não permitem que o embrião preserve seu equilíbrio homeostático, afetando seu desenvolvimento pré-implantacional, promovendo alterações em sua morfologia, proliferação celular, apoptose e metabolismo em curto prazo; podem também surgir problemas a médio e longo prazo, como: baixa taxa de gestação, aumento do risco de aborto, anomalias congênitas, morte pós-natal e, até mesmo, doenças na idade adulta (HENTEMANN et al., 2011). Por esta razão, foi também avaliado o efeito da co-cultura com MSC e MEF em embriões cultivados até estágio de blastocisto.

Após 4 dias de cultivo, os embriões originários dos grupos de maturação *in vitro* em CTRL, MSC e MEF foram distribuídos em co-cultura com MSC, MEF ou em CTRL, formando os seguintes grupos de maturação/cultivo (MIV/CIV): CTRL/CTRL, CTRL/MSC, CTRL/MEF, MSC/CTRL, MSC/MSC, MEF/CTRL e MEF/MEF, para avaliação do desenvolvimento até o estágio de blastocisto, com 7 e 8 dias após o início do cultivo embrionário.

As taxas de embriões em estágio de blastocisto, blastocisto expandido, blastocisto eclodido e blastocistos totais dos grupos experimentais não se diferiram ( $P > 0,05$ ) no dia 7 de cultivo embrionário (Tabela 2).

Só foi observada diferença ( $P < 0,05$ ) na taxa de blastocisto eclodido, no oitavo dia, sendo maior no grupo CTRL/CTRL, quando comparado ao grupo MSC/MSC; no entanto, a proporção de blastocisto, blastocisto expandido e blastocistos totais não foram diferentes entre os grupos experimentais (Tabela 3).

O uso de co-cultura com células somáticas é controverso entre os diversos estudos. A maioria dos estudos indicam maior taxa de blastocisto em sistemas de co-cultura com

diferentes tipos de células somáticas (BONGSO et al., 1989.; WIEMER et al., 1989.; ELLINGTON et al., 1990.; SMITH et al., 1992.; WETZELS et al., 1998.; JOO et al., 2001). Porém, existem estudos indicando que não houve melhora significativa no desenvolvimento embrionário ao utilizar co-cultura (TUCKER et al., 1995.; HU et al., 1998), além de também relatos indicando o efeito negativo da utilização de co-cultura sobre o desenvolvimento pré-implantação embrionário (BERNARDI et al., 1996).

A utilização de MSCs em co-cultura pode fornecer fatores bioativos que poderiam melhorar a maturação meiótica e o desenvolvimento subsequente de embriões produzidos *in vitro* (LING et al., 2008). No entanto, a produção desses fatores pelas células são imensuráveis no momento de sua utilização, tornando um meio instável, que pode ou não favorecer a produção de embriões.

No presente estudo, nem a co-cultura com MSC de ratos e nem a co-cultura com MEF de camundongos, seja na maturação *in vitro* ou no cultivo embrionário, favoreceram o desenvolvimento dos embriões bovinos. Ainda, a combinação de MSC na maturação e no cultivo embrionário reduziu a taxa de eclosão ( $3,6 \pm 1,4\%$ ) quando comparado com o grupo controle ( $14,3 \pm 1,9\%$ ). Alguns poucos estudos utilizaram MSC ou seus derivados para cultivo embrionário, ao utilizar um meio suplementado com materiais bioativos produzidos pelas células mesenquimais de tecido adiposo (meio condicionado) em embriões partenogênicos de suínos, Park et al. (2013), observaram que a adição de 10% desse meio entre os dias 4 e 7 do cultivo embrionário, aumentou a taxa de blastocisto e o número de células embrionárias, quando comparado ao grupo controle, porém, diminuiu quando a adição ocorreu antes, isto é, no dia 2 de cultivo. Isso sugere que a exposição prolongada dos embriões ao meio condicionado com MSC pode trazer resultados negativos. Utilizando bovinos, este mesmo grupo Kim et al. (2011) observou melhora no desenvolvimento

embrionário com meio condicionado obtido com células estaminais embrionárias, mas, somente, quando o grupo controle não era suplementado com soro fetal bovino.

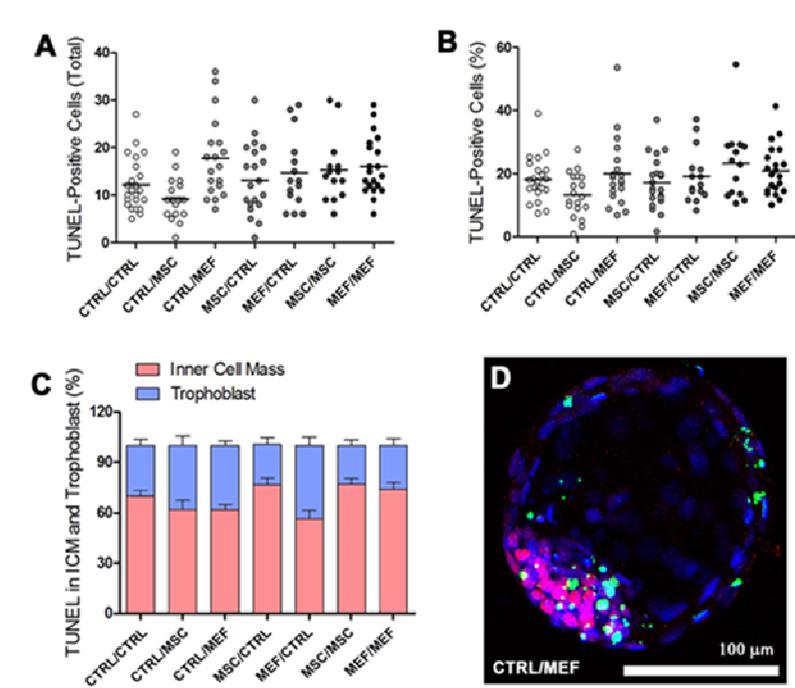
A baixa taxa de eclosão observada com uso de MSC na maturação e no cultivo embrionário diverge de resultado prévio obtido por nosso grupo, que utilizando MSC de ratos em embriões de camundongos (JASMIN et al., 2014). Nesse estudo, observou-se que embriões de camundongos cultivados em co-cultura com MSC ou MEF inativado durante 5 dias melhoraram a taxa de blastocistos eclodidos MSC ( $84,1 \pm 5,8\%$ ) ou MEF ( $90,3 \pm 4,2\%$ ) em relação ao grupo mantido em condição controle CRTL ( $49,2 \pm 8,8\%$ ). O presente resultado também diverge de Heidari et al. (2013), que observaram que o uso de MSC de medula óssea de fetos ovinos em co-cultivo de embriões ovinos melhora a taxa de eclosão, mas sem alterar a taxa de blastocisto.

Os motivos pela falta de efeito positivo em nosso estudo e pela divergência com outros podem ser diversos, como a exposição prolongada aos meios secretados pelas MSC ou MEFs, como observado por Park et al. (2013) com MSC em suínos. Há ainda a presença de soro nos nossos grupos que podem interferir na interpretação dos resultados. De fato, já foi relatado que a utilização de soro em ensaios de cultivo pode eventualmente mascarar os resultados (KIM et al., 2011). Existe também o fator espécie, pois o requerimento nutricional de embriões bovinos pode não ser atendido pelos produtos secretados pela MSC de ratos ou MEF de camundongos. Em verdade, apesar de algumas semelhanças, cada espécie pode ter um requerimento diferente, exigindo diferentes substratos no meio de cultivo (ZANDER-FOX e LANE, 2012). Soma-se, ainda, a possível instabilidade das células em produzir nutrientes bioativos, como fatores de crescimento.

Há também a possibilidade dos embriões bovinos não possuírem receptores para as substâncias biologicamente ativas secretadas pelas células MSC de rato e MEF de

camundongo. Contudo, Lange-Consiglio et al. (2012) salienta que para o desenvolvimento embrionário não é necessário que os fatores biológicos sejam espécie específicos. A fonte das células utilizadas pode também ser um motivo da falta de desempenho dos embriões co-cultivados no nosso estudo. Lange-Consiglio et al. (2012), ao comparar células-tronco epitelial amniótica de equinos com células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea de equinos, notou melhor desenvolvimento de embriões bovinos na utilização de células tronco epitelial amniótica, acreditando que o fator de crescimento epidérmico (EGF) seja o principal fator responsável pelos resultados, assim como ocorre *in vivo* com a presença positiva do endométrio que, por sua vez, disponibiliza EGF para o embrião.

O número de células em apoptose dos embriões bovinos, quantificado através da técnica de TUNEL, não diferiu entre os grupos experimentais, assim como a proporção de células apoptóticas, calculada com base no número total de células (Figura 3).

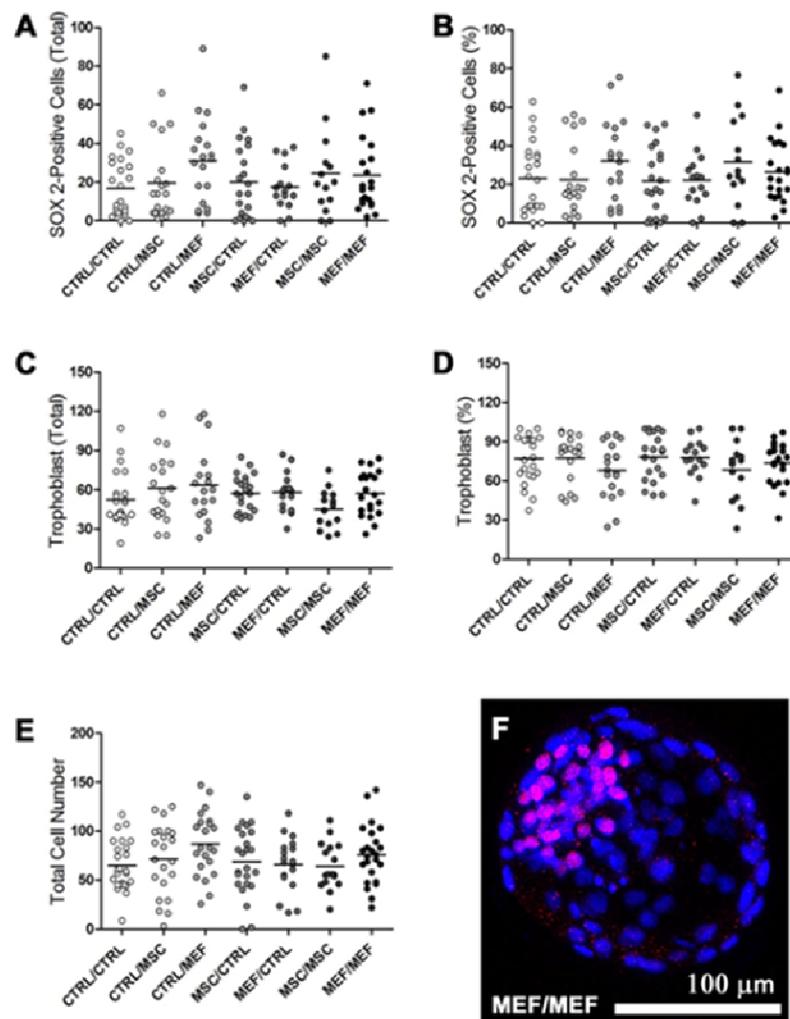


**Figura 3:** Análise de apoptose.

(A) Número de células (TUNEL positivas) por embrião. (B) percentagem de células em apoptose (TUNEL positivas) por embrião. n = 23 para CTRL/CTRL, n = 19 para CTRL/MSC, n = 19 para CTRL/MEF, n = 21 para MSC/CTRL, n = 15 para MEF/CTRL, n = 14 para MSC/MSC e n = 21 para o grupo MEF/MEF. (C) Correlação entre massa celular interna e células do trofoblasto em percentagem. (D) Imagem demonstrativa do anticorpo anti SOX2 (massa celular interna) em vermelho, DAPI (núcleo celular) em azul e TUNEL (Células em apoptose) em verde de embrião do grupo CTRL/MEF. O anticorpo anti SOX2 (vermelho) foi utilizado para diferenciar a massa celular interna do trofoblasto por exclusão, já que todas as células foram contrastadas com DAPI em azul. Abreviaturas dos grupos: condição controle durante toda a produção (CTRL/CTRL); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MSC); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com MEF a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MEF); co-cultivado com MSC na maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MSC/CTRL); co-cultivado com MEF na maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MEF/CTRL); co-cultivado com MSC na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (MSC/MSC); co-cultivado com MEF na maturação seguido de co-cultivo com MEF a partir do dia 4 de cultivo (MEF/MEF).  $P > 0,05$ .

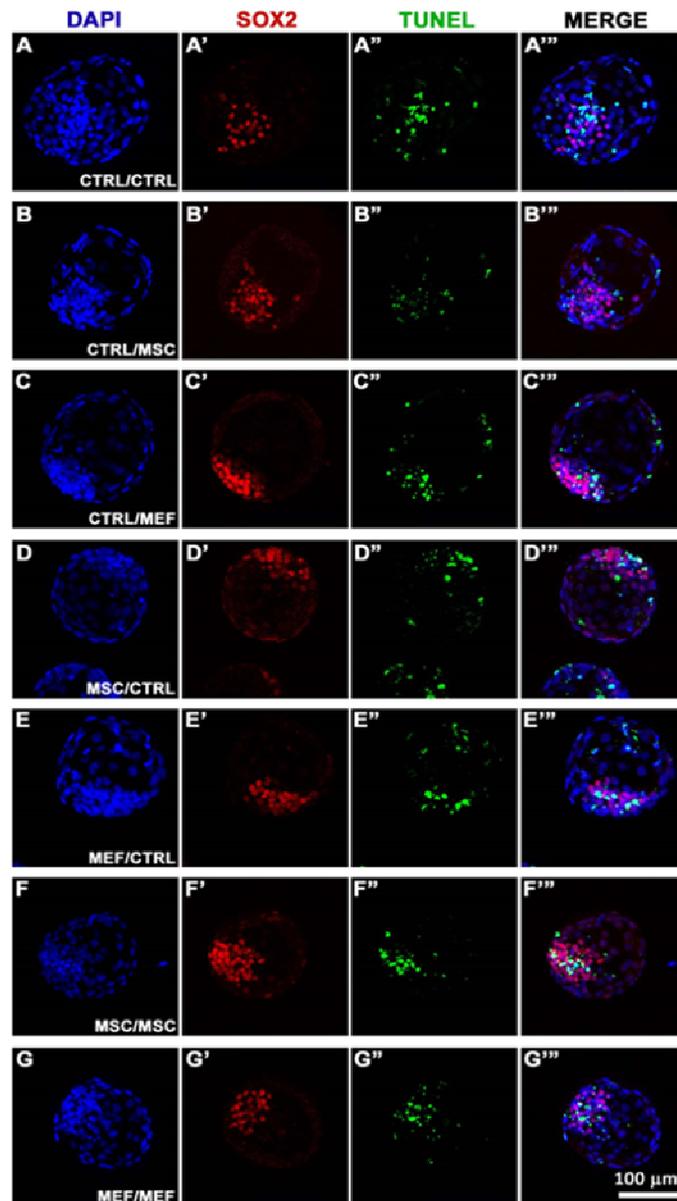
O número total de células embrionárias, quantificado através da marcação de DAPI, foi igual entre os grupos; já em estudo anterior, com camundongo, os grupos co-cultivados em MSC ( $70,9 \pm 2,5$ ) ou MEF ( $74,5 \pm 2,7$ ) apresentaram número de células superior quando comparado ao grupo CTRL ( $60,3 \pm 2,1$ ) (JASMIN et al., 2014). O número de células da massa celular interna, marcadas utilizando anticorpo SOX2 e a correlação entre células do trofoblasto e células da ICM de embriões bovinos, foram estatisticamente iguais entre os grupos experimentais. A ICM é composta de células que darão origem ao organismo do futuro

embrião, além de alguns tecidos extra-embriônico. Sendo assim, não é surpreendente que o tamanho da ICM, medida através do número de células ou da área circunscrita do embrião, seja encarada como um importante indicador de viabilidade e taxa de implantação embrionária (RICHTER et al., 2001). Em estudo com camundongos, os blastocistos co-cultivados com MSC ( $17,0 \pm 1,0$ ) ou MEF ( $17,9 \pm 1,0$ ) apresentou um número absoluto de células da massa celular interna do embrião, significativamente maior quando comparado com o grupo CTRL ( $12,7 \pm 0,9$ ) (JASMIN et al., 2014); já o número total de células do trofoblasto, assim como neste experimento com bovino, não diferiu entre os diferentes grupos (Figura 4). A Figura 5 contém micrografias em confocal representativas de todos os grupos.



**Figura 4:** Marcação para massa Celular interna (SOX2) e núcleo Celular (DAPI).

(A) Número de células SOX2 positivas por embrião. (B) percentagem de células SOX<sup>2</sup> positivas por embrião. (C) Número total de células do trofoblasto por embrião. (D) percentagem de células do trofoblasto por embrião. (E) número total de células por embrião. (F) (imagem representativa). Fotomicrografias mostrando SOX2 positivo (massa celular interna em vermelho) e núcleos marcados com DAPI (azul) de embriões avaliados do grupo MEF/MEF. n = 23 para CTRL/CTRL, n = 19 para CTRL/MSC, n = 19 para CTRL/MEF, n = 21 para MSC/CTRL, n = 15 para MEF/CTRL, n = 14 para MSC/MSC e n = 21 para o grupo MEF/MEF. Abreviaturas dos grupos: condição controle durante toda a produção (CTRL/CTRL); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MSC); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com MEF a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MEF); co-cultivado com MSC na maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MSC/CTRL); co-cultivado com MEF na maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MEF/CTRL); co-cultivado com MSC na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (MSC/MSC); co-cultivado com MEF na maturação seguido de co-cultivo com MEF a partir do dia 4 de cultivo (MEF/MEF).  $P > 0,05$ .



**Figura 5:** Fotomicrografias em cofocal mostrando núcleos das células embrionárias marcados com DAPI (azul), SOX2 positivo marcando (massa celular interna em vermelho) e análise de apoptose (células TUNEL-positivas) mostrados no tom de verde de embriões nas diferentes condições experimentais.

Imagens sequenciais representativas de (AA''') CTRL/CTRL, (BB''') CTRL/MSC, (CC''') CTRL/MEF, (DD''') MSC/CTRL, (EE''') MEF/CTRL, (FF''') MSC/MSC, (GG''') MEF/MEF. Abreviaturas dos grupos: condição controle durante toda a produção (CTRL/CTRL); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MSC); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com

MEF a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MEF); co-cultivado com MSC na maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MSC/CTRL); co-cultivado com MEF na maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MEF/CTRL); co-cultivado com MSC na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (MSC/MSC); co-cultivado com MEF na maturação seguido de co-cultivo com MEF a partir do dia 4 de cultivo (MEF/MEF).

### **Conclusão**

Não houve melhora no desenvolvimento embrionário bovino utilizando co-culturas com MSC de ratos ou MEF de camundongos, quando comparado com sistema de cultura controle.

Mais estudos investigando o uso de células-tronco de outras fontes ou seu meio condicionado, são necessários para se entender melhor o efeito destas células no desenvolvimento embrionário.

### **Agradecimentos**

Agradeço aos meus pais César e Mary, meu irmão Lucas, meus avós Zé Gabiru e Nadir e minhas tias Nilce e Miriam, pelo apoio, para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Agradeço à minha noiva Livia, por me suportar nos momentos de estresse e por me apoiar e incentivar na conclusão deste trabalho.

Agradeço de maneira singular à minha co-orientadora Jasmin, pela dedicação e disposição em estar sempre pronta para me ajudar nesse trabalho.

Ao meu ex-professor e amigo Délcio Bueno da Silva, pelos ensinamentos e por acreditar em mim.

Ao meu orientador professor Luiz Sérgio de Almeida Camargo, pelos ensinamentos ao longo do curso de mestrado.

À Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS) pela oportunidade oferecida.

### Referências

BERNARDI, M. L.; FLECHON, J. E.; DELOUIS, C. Influence of culture system and oxygen tension on the development of ovine zygotes matured and fertilized in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 106, p. 161–167, 1996.

BIGGERS, J. D.; GWATKIN, R. B.; BRINSTER, R. L. Development of mouse embryos in organ cultures of fallopian tubes on a chemically defined medium. **Nauchni Trudove na Visshia Meditsinski Institut**, Sofiia, n. 194, p. 747–749, 1962.

BONGSO, A. et al. Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. **Human Reproduction**, v. 4, p. 706–713, 1989.

ELLINGTON, J. E. et al. Bovine 1–2-cell embryo development using a simple medium in three oviduct epithelial cell coculture systems. **Biology of Reproduction**, v. 43, p. 97–104, 1990.

GELBER, K. et al. A potential use of embryonic stem cell medium for the in vitro culture of preimplantation embryos. **J Assist Reprod Genet**, v. 28, n. 8, p. 59-68, 2011.

GOTTARDI, F. P.; MINGOTI, G. Z. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 33, n. 2, p. 82-94, 2009.

HEIDARI, B. et al. Effect of various co-culture systems on embryo development in ovine. **Czech J. Anim. Sci.**, v. 10, n. 58, p. 443–452, 2013.

HENTEMANN, M.; MOUSAVI, K.; BERTHEUSSEN, K. Differential pH in embryo culture. **Fertil Steril**, v. 95, n. 4, 2011.

HU, Y. et al. Co-culture with assisted hatching of human embryos using Buffalo rat liver cells. **Human Reproduction**, v. 13, p. 165–168, 1998.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores IBGE:** estatística de Produção Pecuária. [S.l.], 2014. 49 p.

JASMIN, J. et al. Otimização do desenvolvimento de embriões in vitro usando células-tronco mesenquimais como camada alimentadora. In : REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE EMBRIÕES, 28., 2014, Natal. **Anais...** Natal, 2014.

JOO, B. S. et al. The mechanism of action of coculture on embryodevelopment in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. **Fertility and Sterility**, v. 75, p. 193–199, 2001.

JOSEFSBERG, L. B. et al. MPF governs MAPK activation and interphase suppression during meiosis of rat oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 68, p. 1282-1290, 2003.

KIM, E. Y. et al. The use of embryonic stem cell derived bioactive material as a new protein supplement for the in vitro culture of bovine embryos. **J Reprod Dev**, v. 57, n. 3, p. 46-54, 2011.

KIM, W. S.; PARK, B. S.; SUNG, J. H. Protective role of adiposederived stem cells and their soluble factors in photoaging. **Arch Dermatol**, Seul, v. 301, n. 5, p. 329-36, 2009.

KLIMANSKAYA, I. et al. Derivation of human embryonic stem cells from single blastomeres. **Nat Protoc**, v. 2, n. 8, p. 63-72, 2007.

KRISHER, R. L. In vivo and in vitro environmental effects on mammalian oocyte quality. **Annu. Rev. Anim. Biosci.**, v. 1, n. 1, p. 393-417, 2013.

LING, B. et al. 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**, v. 41, p. 978–985, 2008.

MARTINS, J.; ALICIO, C. S.; SANCHES, R. Desenvolvimento de embriões após maturação in vitro de oócitos em meio de cultivo suplementado com taurina ou glicina. **Veterinária e Zootecnia**, v. 16, n. 1, p. 89-100, 2012.

ORSI, N. M.; REISCHL, J. B. Mammalian embryo co-culture: trials and tribulations of a misunderstood method. **Theriogenology**, n. 67, p. 441–458, 2007.

PARK, H. Y. . K. E. Y.; LEE, S. E.; CHOI, H. Y. Effect of human adipose tissue-derived mesenchymal-stem-cell bioactive. **Mol. Reprod. Dev.**, , v. 80, n. 20, p. 35-47, 2013.

POMAR, F. J. et al. Differences in the incidence of apoptosis between in vivo and in vitro produced blastocysts of farm animal species: A comparative study. **Theriogenology**, Yalelaan, v. 63, n. 8, out.2004.

SIRARD, M. Follicle environment and quality of in vitro matured oocytes. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 28, n. 6, p. 483-488, 2011.

SIRARD, M. A.; RICHARD, F.; MAYES, M. Controlling meiotic resumption in bovine oocytes: a review. **Theriogenology**, v. 49, p. 483-497, 1998.

SMITH, S. et al. Oviduct epithelial cell co-culture of early porcine embryos. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 33, p. 349–355, 1992.

TIAN, L. L. et al. Human mesenchymal stem cells play a dual role on tumor cell growth in vitro and in vivo. **Journal of Cellular Physiology**, Jinan, v. 226, n. 7, p. 1860–1867, jul. 2011.

TUCKER, M. J. et al. Effect of coculture on subsequent survival and implantation of cryopreserved human embryos. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 12, p. 689–692, 1995.

VILLA-DIAZ, L. G. et al. Analysis of the factors that limit the ability of feeder cells to maintain the undifferentiated state of human embryonic stem cells. **Stem Cells Dev**, v. 18, n. 4, p. 41-51.

WETZELS, A. M. M. et al. The effects of co-culture with human fibroblasts on human embryo development in vitro and implantation. **Human Reproduction**, v. 13, p. 1325–1330, 1998.

WIEMER, K. E. et al. Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. **Fertility and Sterility**, v. 52, p. 503–508, 1989.

ZANDER-FOX, D.; LANE, M. The Future of Human Embryo Culture Media-Or Have We Reached the Ceiling? **INTECH Open Access Publisher**, Adelaide, p. 73-98, mar. 2012.

## Tabelas

**Tabela I.** Avaliação da taxa de clivagem após 4 dias de cultivo

Grupos	n <sup>#</sup>	Degenerados	Clivados
CTRL	772	80	698 (90,4±0,7)
MSC	505	45	465 (92,1±0,9)
MEF	507	23	466 (91,9±1,2)

Valores entre parênteses são porcentagens.

# Para cada grupo foram realizadas 12 repetições

**Tabela 1:** Avaliação da taxa de embriões clivados após 4 dias de cultivo.

Os oócitos foram maturados em condição Controle (CTRL), em co-cultivo com células mesenquimais (MSC) ou co-cultivo com fibroblastos (MEF). P>0,05.

**Tabela II.** Avaliação dos estágios de desenvolvimento embrionário após 7 dias de cultivo

Grupos	n <sup>#</sup>	Blastocistos	Blastocistos expandidos	Blastocistos eclodidos	Total de blastocistos
CTRL/CTRL	258	35 (13,6±2,3)	50 (19,4±2,8)	10 (3,9±1,1)	95 (36,8±3,1)
CTRL/MSC	251	45 (17,8±2,5)	59 (22,9±2,7)	4 (1,5±0,8)	108 (43,0±3,6)
CTRL/MEF	263	34 (12,9±1,8)	66 (25,1±2,5)	9 (3,4±1,6)	109 (41,4±3,8)
MSC/CTRL	253	50 (19,8±1,7)	44 (17,4±3,0)	11 (4,2±1,9)	105 (41,5±4,0)
MEF/CTRL	259	24 (9,3±2,0)	53 (20,5±1,9)	6 (2,3±1,0)	83 (32,0±2,2)
MSC/MSC	252	37 (14,7±2,0)	50 (19,8±2,5)	3 (1,2±0,9)	90 (35,7±2,2)
MEF/MEF	248	40 (16,1±2,2)	43 (17,3±3,3)	1 (0,4±0,4)	84 (33,9±3,4)

Valores entre parênteses são porcentagens.

# Para cada grupo foram realizadas 12 repetições

**Tabela 2:** Avaliação dos estágios de desenvolvimento embrionário após 7 dias de cultivo.

Abreviaturas dos grupos: condição controle durante toda a produção (CTRL/CTRL); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MSC); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com MEF a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MEF); co-cultivado com MSC na maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MSC/CTRL); co-cultivado com MEF na

maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MEF/CTRL); co-cultivado com MSC na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (MSC/MSC); co-cultivado com MEF na maturação seguido de co-cultivo com MEF a partir do dia 4 de cultivo (MEF/MEF). Valores são mostrados como média±erro padrão sobre a média.  $P>0,05$ .

**Tabela III.** Avaliação dos estágios de desenvolvimento embrionário após 8 dias de cultivo

Grupos	n <sup>#</sup>	Blastocistos	Blastocistos expandidos	Blastocistos eclodidos	Total de blastocistos
CTRL/CTRL	258	18 (7,0±0,9)	51 (19,8±2,8)	37 (14,3±1,9)	106 (41,1±3,4)
CTRL/MSC	251	36 (14,3±2,0)	63 (25,1±2,2)	15 (6,0±2,0)	114 (45,4±3,4)
CTRL/MEF	263	14 (5,3±1,8)	71 (26,7±3,1)	31 (11,8±3,7)	116 (44,1±3,4)
MSC/CTRL	253	23 (9,1±1,7)	47 (18,6±2,4)	41 (16,2±3,5)	111 (43,9±4,4)
MEF/CTRL	259	14 (5,4±1,3)	55 (21,2±2,7)	28 (10,8±2,3)	97 (37,4±2,8)
MSC/MSC	252	28 (11,1±1,9)	64 (25,4±3,4)	9 (3,6±1,4)*	101 (40,1±2,1)
MEF/MEF	248	17 (6,8±1,6)	53 (21,4±2,9)	20 (8,1±2,7)	90 (36,3±2,8)

Valores entre parênteses são porcentagens.

\* Em relação ao grupo CTRL/CTRL.  $P<0,05$ .

# Para cada grupo foram realizadas 12 repetições.

**Tabela 3:** Avaliação dos estágios de desenvolvimento embrionário após 8 dias de cultivo.

Abreviaturas dos grupos: condição controle durante toda a produção (CTRL/CTRL); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MSC); condição controle na maturação seguido de co-cultivo com MEF a partir do dia 4 de cultivo (CTRL/MEF); co-cultivado com MSC na maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MSC/CTRL); co-cultivado com MEF na maturação seguido de condição controle durante todo o período de cultivo (MEF/CTRL); co-cultivado com MSC na maturação seguido de co-cultivo com MSC a partir do dia 4 de cultivo (MSC/MSC); co-cultivado com MEF na maturação seguido de co-cultivo com MEF a partir do dia 4 de cultivo (MEF/MEF). Valores são mostrados como média±erro padrão sobre a média. \* Indica diferença com o grupo controle ( $P < 0,05$ ).

## **6. Anexos – Normas para publicação – Revista Pesquisa Agropecuária Brasileira.**

A revista Pesquisa Agropecuária Brasileira (PAB) é uma publicação mensal da Embrapa, que edita e publica trabalhos técnico-científicos originais, em português, espanhol ou inglês, resultantes de pesquisas de interesse agropecuário. A principal forma de contribuição é o Artigo, mas a PAB também publica Notas Científicas e Revisões a convite do Editor.

### **Análise dos artigos**

A Comissão Editorial faz a análise dos trabalhos antes de submetê-los à assessoria científica. Nessa análise, consideram-se aspectos como escopo, apresentação do artigo segundo as normas da revista, formulação do objetivo de forma clara, clareza da redação, fundamentação teórica, atualização da revisão da literatura, coerência e precisão da metodologia, resultados com contribuição significativa, discussão dos fatos observados em relação aos descritos na literatura, qualidade das tabelas e figuras, originalidade e consistência das conclusões. Após a aplicação desses critérios, se o número de trabalhos aprovados ultrapassa a capacidade mensal de publicação, é aplicado o critério da relevância relativa, pelo qual são aprovados os trabalhos cuja contribuição para o avanço do conhecimento científico é considerada mais significativa. Esse critério é aplicado somente aos trabalhos que atendem aos requisitos de qualidade para publicação na revista, mas que, em razão do elevado número, não podem ser todos aprovados para publicação. Os trabalhos rejeitados são devolvidos aos autores e os demais são submetidos à análise de assessores científicos, especialistas da área técnica do artigo.

### **Forma e preparação de manuscritos**

Os trabalhos enviados à PAB devem ser inéditos (não terem dados – tabelas e figuras – publicadas parcial ou integralmente em nenhum outro veículo de divulgação técnico-científica, como boletins institucionais, anais de eventos, comunicados técnicos, notas científicas etc.) e não podem ter sido encaminhados simultaneamente a outro periódico científico ou técnico. Dados publicados na forma de resumos, com mais de 250 palavras, não devem ser incluídos no trabalho.

- São considerados, para publicação, os seguintes tipos de trabalho: Artigos Científicos, Notas Científicas e Artigos de Revisão, este último a convite do Editor.

- Os trabalhos publicados na PAB são agrupados em áreas técnicas, cujas principais são: Entomologia, Fisiologia Vegetal, Fitopatologia, Fitotecnia, Fruticultura, Genética, Microbiologia, Nutrição Mineral, Solos e Zootecnia.

- O texto deve ser digitado no editor de texto Microsoft Word, em espaço duplo, fonte Times New Roman, corpo 12, folha formato A4, com margens de 2,5 cm e com páginas e linhas numeradas.

### **Organização do Artigo Científico**

A ordenação do artigo deve ser feita da seguinte forma:

- Artigos em português - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumo, Termos para indexação, título em inglês, Abstract, Index terms, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos, Referências, tabelas e figuras.
- Artigos em inglês - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Abstract, Index terms, título em português, Resumo, Termos para indexação, Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion, Conclusions, Acknowledgements, References, tables, figures.
- Artigos em espanhol - Título, autoria, endereços institucionais e eletrônicos, Resumen, Términos para indexación; título em inglês, Abstract, Index terms, Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión, Conclusiones, Agradecimientos, Referencias, cuadros e figuras.
- O título, o resumo e os termos para indexação devem ser vertidos fielmente para o inglês, no caso de artigos redigidos em português e espanhol, e para o português, no caso de artigos redigidos em inglês.
- O artigo científico deve ter, no máximo, 20 páginas, incluindo-se as ilustrações (tabelas e figuras), que devem ser limitadas a seis, sempre que possível.

### **Título**

- Deve representar o conteúdo e o objetivo do trabalho e ter no máximo 15 palavras, incluindo-se os artigos, as preposições e as conjunções.
- Deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve ser iniciado com palavras chaves e não com palavras como “efeito” ou “influência”.
- Não deve conter nome científico, exceto de espécies pouco conhecidas; neste caso, apresentar somente o nome binário.
- Não deve conter subtítulo, abreviações, fórmulas e símbolos.
- As palavras do título devem facilitar a recuperação do artigo por índices desenvolvidos por bases de dados que catalogam a literatura.

### **Nomes dos autores**

- Grafar os nomes dos autores com letra inicial maiúscula, por extenso, separados por vírgula; os dois últimos são separados pela conjunção “e”, “y” ou “and”, no caso de artigo em português, espanhol ou em inglês, respectivamente.
- O último sobrenome de cada autor deve ser seguido de um número em algarismo arábico, em forma de expoente, entre parênteses, correspondente à chamada de endereço do autor.

### **Endereço dos autores**

- São apresentados abaixo dos nomes dos autores, o nome e o endereço postal completos da instituição e o endereço eletrônico dos autores, indicados pelo número em algarismo arábico, entre parênteses, em forma de expoente.
- Devem ser agrupados pelo endereço da instituição.
- Os endereços eletrônicos de autores da mesma instituição devem ser separados por vírgula.

### **Resumo**

- O termo Resumo deve ser grafado em letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda, e separado do texto por travessão.
- Deve conter, no máximo, 200 palavras, incluindo números, preposições, conjunções e artigos.
- Deve ser elaborado em frases curtas e conter o objetivo, o material e os métodos, os resultados e a conclusão.
- Não deve conter citações bibliográficas nem abreviaturas.
- O final do texto deve conter a principal conclusão, com o verbo no presente do indicativo.

### **Termos para indexação**

- A expressão Termos para indexação, seguida de dois-pontos, deve ser grafada em letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Os termos devem ser separados por vírgula e iniciados com letra minúscula.
- Devem ser no mínimo três e no máximo seis, considerando-se que um termo pode possuir duas ou mais palavras.
- Não devem conter palavras que componham o título.
- Devem conter o nome científico (só o nome binário) da espécie estudada.
- Devem, preferencialmente, ser termos contidos no AGROVOC: Multilingual Agricultural Thesaurus ou no Índice de Assuntos da base SciELO.

### **Introdução**

- A palavra Introdução deve ser centralizada e grafada com letras minúsculas, exceto a letra inicial, e em negrito.
- Deve apresentar a justificativa para a realização do trabalho, situar a importância do problema científico a ser solucionado e estabelecer sua relação com outros trabalhos publicados sobre o assunto.

- O último parágrafo deve expressar o objetivo de forma coerente com o descrito no início do Resumo.

### **Material e Métodos**

- A expressão Material e Métodos deve ser centralizada e grafada em negrito; os termos Material e Métodos devem ser grafados com letras minúsculas, exceto as letras iniciais.
- Deve ser organizado, de preferência, em ordem cronológica.
- Deve apresentar a descrição do local, a data e o delineamento do experimento, e indicar os tratamentos, o número de repetições e o tamanho da unidade experimental.
- Deve conter a descrição detalhada dos tratamentos e variáveis.
- Deve-se evitar o uso de abreviações ou as siglas.
- Os materiais e os métodos devem ser descritos de modo que outro pesquisador possa repetir o experimento.
- Devem ser evitados detalhes supérfluos e extensas descrições de técnicas de uso corrente.
- Deve conter informação sobre os métodos estatísticos e as transformações de dados.
- Deve-se evitar o uso de subtítulos; quando indispensáveis, grafá-los em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial, na margem esquerda da página.

### **Resultados e Discussão**

- A expressão Resultados e Discussão deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Todos os dados apresentados em tabelas ou figuras devem ser discutidos.
- As tabelas e figuras são citadas seqüencialmente.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto, mas discutidos em relação aos apresentados por outros autores.
- Evitar o uso de nomes de variáveis e tratamentos abreviados.
- Dados não apresentados não podem ser discutidos.
- Não deve conter afirmações que não possam ser sustentadas pelos dados obtidos no próprio trabalho ou por outros trabalhos citados.
- As chamadas às tabelas ou às figuras devem ser feitas no final da primeira oração do texto em questão; se as demais sentenças do parágrafo referirem-se à mesma tabela ou figura, não é necessária nova chamada.
- Não apresentar os mesmos dados em tabelas e em figuras.

- As novas descobertas devem ser confrontadas com o conhecimento anteriormente obtido.

### **Conclusões**

- O termo **Conclusões** deve ser centralizado e grafado em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser apresentadas em frases curtas, sem comentários adicionais, com o verbo no presente do indicativo.
- Devem ser elaboradas com base no objetivo do trabalho.
- Não podem consistir no resumo dos resultados.
- Devem apresentar as novas descobertas da pesquisa.
- Devem ser numeradas e no máximo cinco.

### **Agradecimentos**

- A palavra **Agradecimentos** deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser breves e diretos, iniciando-se com “Ao, Aos, À ou Às” (pessoas ou instituições).
- Devem conter o motivo do agradecimento.

### **Referências**

- A palavra *Referências* deve ser centralizada e grafada em negrito, com letras minúsculas, exceto a letra inicial.
- Devem ser de fontes atuais e de periódicos: pelo menos 70% das referências devem ser dos últimos 10 anos e 70% de artigos de periódicos.
- Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 6023 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.
- Devem ser apresentadas em ordem alfabética dos nomes dos autores, separados por ponto-e-vírgula, sem numeração.
- Devem apresentar os nomes de todos os autores da obra.
- Devem conter os títulos das obras ou dos periódicos grafados em negrito.
- Devem conter somente a obra consultada, no caso de citação de citação.
- Todas as referências devem registrar uma data de publicação, mesmo que aproximada.
- Devem ser trinta, no máximo.

Exemplos:

- Artigos de Anais de Eventos (aceitos apenas trabalhos completos)

AHRENS, S. A fauna silvestre e o manejo sustentável de ecossistemas florestais. In: SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO SOBRE MANEJO FLORESTAL, 3., 2004, Santa Maria. **Anais**. Santa Maria: UFSM, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, 2004. p.153-162.

- Artigos de periódicos

SANTOS, M.A. dos; NICOLÁS, M.F.; HUNGRIA, M. Identificação de QTL associados à simbiose entre *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* e soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.67-75, 2006.

- Capítulos de livros

AZEVEDO, D.M.P. de; NÓBREGA, L.B. da; LIMA, E.F.; BATISTA, F.A.S.; BELTRÃO, N.E. de M. Manejo cultural. In: AZEVEDO, D.M.P.; LIMA, E.F. (Ed.). **O agronegócio da mamona no Brasil**. Campina Grande: Embrapa Algodão; Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p.121-160.

- Livros

OTSUBO, A.A.; LORENZI, J.O. **Cultivo da mandioca na Região Centro-Sul do Brasil**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Cruz das Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura, 2004. 116p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Sistemas de produção, 6).

- Teses

HAMADA, E. **Desenvolvimento fenológico do trigo (cultivar IAC 24 - Tucuruí), comportamento espectral e utilização de imagens NOAA-AVHRR**. 2000. 152p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

- Fontes eletrônicas

EMBRAPA AGROPECUÁRIA OESTE. **Avaliação dos impactos econômicos, sociais e ambientais da pesquisa da Embrapa Agropecuária Oeste: relatório do ano de 2003**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 97p. (Embrapa Agropecuária Oeste. Documentos, 66). Disponível em: . Acesso em: 18 abr. 2006.

## Citações

- Não são aceitas citações de resumos, comunicação pessoal, documentos no prelo ou qualquer outra fonte, cujos dados não tenham sido publicados. - A autocitação deve ser evitada. - Devem ser normalizadas de acordo com a NBR 10520 da ABNT, com as adaptações descritas a seguir.

- Redação das citações dentro de parênteses

- Citação com um autor: sobrenome grafado com a primeira letra maiúscula, seguido de vírgula e ano de publicação.
- Citação com dois autores: sobrenomes grafados com a primeira letra maiúscula, separados pelo "e" comercial (&), seguidos de vírgula e ano de publicação.
- Citação com mais de dois autores: sobrenome do primeiro autor grafado com a primeira letra maiúscula, seguido da expressão et al., em fonte normal, vírgula e ano de publicação.
- Citação de mais de uma obra: deve obedecer à ordem cronológica e em seguida à ordem alfabética dos autores.
- Citação de mais de uma obra dos mesmos autores: os nomes destes não devem ser repetidos; colocar os anos de publicação separados por vírgula.
- Citação de citação: sobrenome do autor e ano de publicação do documento original, seguido da expressão “citado por” e da citação da obra consultada.
- Deve ser evitada a citação de citação, pois há risco de erro de interpretação; no caso de uso de citação de citação, somente a obra consultada deve constar da lista de referências.
- Redação das citações fora de parênteses
- Citações com os nomes dos autores incluídos na sentença: seguem as orientações anteriores, com os anos de publicação entre parênteses; são separadas por vírgula.

### **Fórmulas, expressões e equações matemáticas**

- Devem ser iniciadas à margem esquerda da página e apresentar tamanho padronizado da fonte Times New Roman.
- Não devem apresentar letras em itálico ou negrito, à exceção de símbolos escritos convencionalmente em itálico.

### **Tabelas**

- As tabelas devem ser numeradas seqüencialmente, com algarismo arábico, e apresentadas em folhas separadas, no final do texto, após as referências.
- Devem ser auto-explicativas.
- Seus elementos essenciais são: título, cabeçalho, corpo (colunas e linhas) e coluna indicadora dos tratamentos ou das variáveis.
- Os elementos complementares são: notas-de-rodapé e fontes bibliográficas.
- O título, com ponto no final, deve ser precedido da palavra Tabela, em negrito; deve ser claro, conciso e completo; deve incluir o nome (vulgar ou científico) da espécie e das variáveis dependentes.

- No cabeçalho, os nomes das variáveis que representam o conteúdo de cada coluna devem ser grafados por extenso; se isso não for possível, explicar o significado das abreviaturas no título ou nas notas-de-rodapé.
- Todas as unidades de medida devem ser apresentadas segundo o Sistema Internacional de Unidades.
- Nas colunas de dados, os valores numéricos devem ser alinhados pelo último algarismo.
- Nenhuma célula (cruzamento de linha com coluna) deve ficar vazia no corpo da tabela; dados não apresentados devem ser representados por hífen, com uma nota-de-rodapé explicativa.
- Na comparação de médias de tratamentos são utilizadas, no corpo da tabela, na coluna ou na linha, à direita do dado, letras minúsculas ou maiúsculas, com a indicação em nota-de-rodapé do teste utilizado e a probabilidade.
- Devem ser usados fios horizontais para separar o cabeçalho do título, e do corpo; usá-los ainda na base da tabela, para separar o conteúdo dos elementos complementares. Fios horizontais adicionais podem ser usados dentro do cabeçalho e do corpo; não usar fios verticais.
- As tabelas devem ser editadas em arquivo Word, usando os recursos do menu Tabela; não fazer espaçamento utilizando a barra de espaço do teclado, mas o recurso recuo do menu Formatar Parágrafo.
- Notas de rodapé das tabelas
- Notas de fonte: indicam a origem dos dados que constam da tabela; as fontes devem constar nas referências.
- Notas de chamada: são informações de caráter específico sobre partes da tabela, para conceituar dados. São indicadas em algarismo arábico, na forma de expoente, entre parênteses, à direita da palavra ou do número, no título, no cabeçalho, no corpo ou na coluna indicadora. São apresentadas de forma contínua, sem mudança de linha, separadas por ponto.
- Para indicação de significância estatística, são utilizadas, no corpo da tabela, na forma de expoente, à direita do dado, as chamadas ns (não-significativo); \* e \*\* (significativo a 5 e 1% de probabilidade, respectivamente).

## **Figuras**

- São consideradas figuras: gráficos, desenhos, mapas e fotografias usados para ilustrar o texto.
- Só devem acompanhar o texto quando forem absolutamente necessárias à documentação dos fatos descritos.

- O título da figura, sem negrito, deve ser precedido da palavra Figura, do número em algarismo arábico, e do ponto, em negrito.
- Devem ser auto-explicativas.
- A legenda (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura, no título, ou entre a figura e o título.
- Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas, e devem ser seguidas das unidades entre parênteses.
- Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas; as fontes devem ser referenciadas.
- O crédito para o autor de fotografias é obrigatório, como também é obrigatório o crédito para o autor de desenhos e gráficos que tenham exigido ação criativa em sua elaboração. - As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.
- Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como: círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).
- Os números que representam as grandezas e respectivas marcas devem ficar fora do quadrante.
- As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.
- Devem ser elaboradas de forma a apresentar qualidade necessária à boa reprodução gráfica e medir 8,5 ou 17,5 cm de largura.
- Devem ser gravadas nos programas Word, Excel ou Corel Draw, para possibilitar a edição em possíveis correções.
- Usar fios com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura.
- No caso de gráfico de barras e colunas, usar escala de cinza (exemplo: 0, 25, 50, 75 e 100%, para cinco variáveis).
- Não usar negrito nas figuras.
- As figuras na forma de fotografias devem ter resolução de, no mínimo, 300 dpi e ser gravadas em arquivos extensão TIF, separados do arquivo do texto.
- Evitar usar cores nas figuras; as fotografias, porém, podem ser coloridas.

Contatos com a secretaria da revista podem ser feitos por telefone: (61)3448-4231, via e-mail: [sct.pab@embrapa.br](mailto:sct.pab@embrapa.br) ou pelos correios: Embrapa Informação Tecnológica Pesquisa Agropecuária Brasileira – PAB Caixa Postal 040315 CEP 70770 901 Brasília, DF.