

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Avaliação da eficácia de meios de cultivo
específicos para células-tronco humanas no
desenvolvimento *in vitro* de embriões de
camundongo

Fernando Marques Guimarães

Rio de Janeiro
2018



UFRJ

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE MEIOS DE CULTIVO ESPECÍFICOS PARA
CÉLULAS-TRONCO HUMANAS NO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE
EMBRIÕES DE CAMUNDONGO

Fernando Marques Guimarães

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica da
Universidade Federal do Rio de Janeiro como parte
dos requisitos necessários à obtenção do título de
Mestre

Orientador: Prof. Dr. Marcel Frajblat

Rio de Janeiro, agosto de 2018

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE MEIOS DE CULTIVO ESPECÍFICOS PARA
CÉLULAS-TRONCO HUMANAS NO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE
EMBRIÕES DE CAMUNDONGO

Fernando Marques Guimarães

Orientador: Marcel Frajblat

Dissertação de Mestrado Profissional submetida ao Programa de Pós-graduação em Formação para a Pesquisa Biomédica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Aprovada por:

Presidente, Prof. Dr. Marcel Frajblat

Prof.

Prof.

Prof.

Prof.

FICHA CATALOGRÁFICA

RESUMO

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE MEIOS DE CULTIVO ESPECÍFICOS PARA CÉLULAS-TRONCO HUMANAS NO DESENVOLVIMENTO IN VITRO DE EMBRIÕES DE CAMUNDONGO

Fernando Marques Guimarães
Orientador: Prof. Dr. Marcel Frajblat

Resumo da Dissertação de Mestrado Profissional submetida ao Programa de Pós-graduação em Formação para a Pesquisa Biomédica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Meios para o cultivo de células-tronco embrionárias são completos e podem suportar a manutenção dos tipos celulares presentes em um embrião. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento dos embriões de camundongo do estágio de clivagem até blastocisto e obter a taxa de formação de blastocistos expandidos e eclodidos em três meios comerciais para células-tronco embrionárias. Foram utilizadas 72 fêmeas de camundongos FVB, das quais foram coletados 293 embriões em estágio de duas células que foram distribuídos aleatoriamente e cultivados nos meios GV-Blast (controle), E8, Mters e Stem Macs até o estágio de blastocisto. O meio E8 apresentou menores taxas de formação de blastocistos que os outros meios. Os meios de cultivo para células-tronco embrionárias foram capazes de suportar o desenvolvimento embrionário in vitro e este potencial deve continuar a ser explorado para que a medicina reprodutiva tenha maior opção de meios para alcançar o sucesso da gravidez.

Palavras-chave: Meio de cultivo, embrião, células-tronco, Reprodução Assistida, camundongo, humano, blastocisto.

Rio de Janeiro, Agosto de 2018

ABSTRACT

EVALUATION OF HUMAN STEM CELLS CULTURE MEDIA EFFICACY IN THE DEVELOPMENT OF MOUSE EMBRYOS IN VITRO.

Fernando Marques Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Marcel Frajblat

Abstract da Dissertação de Mestrado Profissional submetida ao Programa de Pós-graduação em Formação para a Pesquisa Biomédica da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre.

Media used for the culture of embryonic stem cells are complete and can support the maintenance of the cell types present in an embryo. The purpose of this study was to evaluate the development of mouse embryos from the cleavage stage to the blastocyst and to obtain the rate of formation of expanded and hatched blastocysts in three commercial media for embryonic stem cells. Seventy-two female FVB mice were collected from 293 two-cell embryos that were randomly distributed and cultured on the GV-Blast (control), E8, Mters and Stem Mac media until the blastocyst stage. The Stem Macs and Mters had development rates similar to the control medium. The E8 medium had lower blastocyst rates than the other media. The culture media for embryonic stem cells were able to support embryonic development in vitro and this potential should continue to be explored so that reproductive medicine has a greater chance to achieve better pregnancy success.

Keywords: Culture medium, embryo, stem cells, Assisted Reproduction, mouse, human, blastocyst.

Rio de Janeiro, Agosto de 2018

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele.”

Buda

AGRADECIMENTOS

Aos Animais utilizados nesta pesquisa, e que puderam viabilizar todos os resultados obtidos, meu profundo reconhecimento e respeito.

A meus pais, Fernando (IN MEMORIAN) e Gevanete, meu mais profundo agradecimento. Um amor incondicional, com dedicação plena a educação dos filhos, e que principalmente acreditaram em dias melhores, fato este que me fortaleceu e me fez crescer e estar aqui neste momento.

Aos meus irmãos Franklin e Flávio pela parceria desde pequenos, pela honestidade um com o outro, pelo amor de irmão simples e puro.

A minha querida esposa, Aline, por ser um centro tão importante em minha vida, por estar ao meu lado nos momentos felizes, nos momentos de tristeza, bem como na construção de nossa família, sempre me fazendo acreditar que posso ser um pouco mais do que sou, que posso caminhar mais do que acredito, que posso levantar todas as vezes que caio. Obrigado por ter acreditado na busca deste sonho e transformado em um dos nossos sonhos partilhados com alegria e dedicação!

Ao meu filho amado Caio que mesmo sem saber esteve sempre tão presente no dia a dia, inclusive estando em alguns momentos presente nos experimentos me questionando e fazendo suas observações com relação ao que estava sendo realizado, me inspirando cada vez mais para que o desenvolvimento deste trabalho fosse único.

Ao meu grande amigo e Orientador Professor Marcel Frajblat primeiro por ter incentivado esta minha inserção na academia e segundo pela orientação, competência, profissionalismo e dedicação sempre tão presentes no dia a dia. Obrigado por acreditar e sempre estimular!

As minhas queridas enteadas Maria Eduarda e Letícia meu agradecimento especial, pois, fizeram parte desta empreitada de alguma forma.

A minha amiga Mariana Gonçalves, meu mais sincero agradecimento por toda a parceria e amizade que tivemos desde o primeiro dia de Aula do mestrado, guardarei no meu coração todos os nossos encontros, debates e sorrisos.

Aos colegas Stevens, Ismael e Marcelinho membros do laboratório Lance, por todo o apoio oferecido.

Ao Dr. Gilberto Almodim e a todo staff da Ingamed especialmente a Monique, pela parceria e dedicação em diversos momentos e necessidades.

Às minhas colegas do Laboratório de Animais Transgênicos, Livia e Priscila, que auxiliaram na parte logística e prática deste projeto. Sem elas seria muito mais difícil o caminho!

A todos os amigos que fiz na turma de mestrado, principalmente Madellon e Lilian que fortificaram tanto esta jornada.

Aos professores Tânia e Ronaldo, sempre presentes e dispostos a ajudar no que fosse necessário.

Agradecimento especial a duas amigas e profissionais tanto da área acadêmica como da área de reprodução assistida Raquel Alvarenga e Priscila Totaro, pelo apoio e colaboração nos conselhos e debates referentes a este projeto.

Aos amigos e parceiros de trabalho do Centro de Fertilidade Vida, Maria Cecília, Caio, Vanessa, Paula e Mariana, pela efetiva parceria em um momento tão único e crucial na minha vida.

A todos os amigos e familiares que de alguma forma vibraram positivamente e se fizeram presentes, a minha gratidão plena.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE ABREVIACES.....	xi
1.INTRODUO	13
2. REVISO DE LITERATURA	13
2.1. Histrico	13
2.2. Definio das Tcnicas de Reproduo Assistida	15
2.3. Transferncia embrionria	16
2.4. Meios de cultivo embrionrios.....	19
2.5. Meios de cultivo sequenciais e contnuos	21
2.6. Componentes dos meios de cultivo	21
2.7. Clulas-tronco embrionrias	26
2.8. Meio de cultivo para clulas-tronco embrionrias	27
2.9. Meios para Clulas-tronco embrionrias em cultivo de embries	29
3. OBJETIVO GERAL.....	31
3.1. Objetivos especficos:	31
4. JUSTIFICATIVA.....	32
5. MATERIAL E MTODOS	33
5.1. Animais	33
5.2. Superovulao das fmeas de camundongos	33
5.3. Coleta dos embries em estgio de duas clulas	34
5.4. Cultivo embrionrio nos meios experimentais.....	35
5.5. Avaliao dos embries	35
6. ANALISE ESTATSTICA	37
7. RESULTADOS	38
7.1 Custos dos meios Testados.....	41
8. DISCUSSO	42
9. CONCLUSO.....	51
10. PRODUTO	51
11. REFERNCIAS BIBLIOGRFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Necessidade da transferência única de embrião	18
Figura 2: Como alcançar a transferência única de embrião.....	20
Figura 3: Possíveis fatores associados à produção de um blastocisto de maior qualidade	25
Figura 4 Taxa de formação de blastocistos com embriões de camundongo cultivados a partir do estágio duas células nos meios Stem Macs, Mtesr, E8 e GV Blast (controle)	38
Figura 5: Embriões em estágio de clivagem (2 células) (A) Embriões em estágio blastocistos expandidos e eclodidos (B) ao fim do período de cultivo. Barra = 100µm	39
Figura 6A, taxas calculadas a partir do número de embriões de duas células que iniciou o cultivo. Figura 6B, taxas calculadas a partir do número de embriões que chegou até o estágio de blastocisto	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Estimativa de custo dos meios de cultivo testados (Stem Macs, E8 e MteSR) se usados na rotina da clínica de reprodução assistida	40
--	----

LISTA DE ABREVIações

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BME: β -mercaptoetanol

BSA: Albumina sérica bovina, (do inglês: *bovine serum albumin*).

CFM: Conselho Federal de Medicina

CGH: Hibridização genômica comparativa (do inglês: *Comparative genomic hybridization*).

CNPq: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CTEs: células-tronco embrionárias

CTs: células-tronco

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dubelco, (do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)

E8: Essencial 8, (do inglês: *Essential 8*)

eCG: gonadotropina coriônica equina, (do inglês: *equine Corionic Gonadotropin*)

EDTA: ácido etileno diamono tetracético, (do inglês: *ethylenediamine tetraacetic acid*)

ESC: Células Tronco Embrionárias, (do inglês: *embryonic stem cells*)

ESCM: Meio para Células-tronco embrionárias, (do inglês: *embryonic stem cells medium*)

FIV: fertilização *in vitro*

hCG: gonadotropina coriônica humana, (do inglês: *human Corionic Gonadotropin*)

ICSI: Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides, (do inglês: *Intracytoplasmatic Sperm Injection*)

iPSC: Células-tronco Pluripotentes Induzidas, (do inglês: *induced pluripotent stem cells*)

MCI: massa celular interna

MEA: Ensaio Embrionário do Rato, (do inglês: *mouse embryonic assay*).

NGS: Sequenciamento de nova geração, (do inglês: *next-generation sequencing*).

OMS: Organização Mundial da Saúde

PSCs: Células-Tronco Pluripotentes, (do inglês: *pluripotent stem cells*)

RA: reprodução assistida

RHA: reprodução humana assistida

SBE: Sociedade Brasileira de Esterilidade

SBRH: Sociedade Brasileira de Reprodução Humana

SSS: Suplemento substituto de soro do inglês: *Serum Substitute Supplement*

TE: trofoectoderma

TRA: técnicas de reprodução assistida

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UTIs: unidades de tratamento intensivo

VTN-N: vitronectina

1.INTRODUÇÃO

A ocorrência de gestações múltiplas é um dos principais problemas associados a reprodução assistida humana e a realização de transferência única de embrião é o principal caminho para a redução desses problemas. Para isso é necessário uma boa qualidade dos meios de cultivo e a seleção de embriões mais aptos a iniciar a gestação. Sendo assim, meios para o cultivo de células-tronco embrionárias são completos e podem suportar a manutenção dos tipos celulares presentes em um embrião. O objetivo deste trabalho foi avaliar o desenvolvimento dos embriões de camundongo do estágio de clivagem até blastocisto e obter a taxa de formação de blastocistos expandidos e eclodidos em três meios comerciais para células-tronco embrionárias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Histórico

O conjunto de técnicas, tecnologias, equipamentos, procedimentos médicos e biomédicos utilizados para a união dos gametas feminino e masculino fora do corpo da mulher (fertilização in vitro - FIV) é chamado de: “reprodução assistida” (RA), “reprodução humana assistida” (RHA), ou ainda “técnicas de reprodução assistida” (TRA), termos que não diferem na prática (CORRÊA & LOYOLA, 2015).

No Brasil, o primeiro passo em direção ao desenvolvimento dessas práticas se deu em 26 de dezembro de 1947, data da fundação da Sociedade Brasileira de Esterilidade (SBE) na cidade do Rio De Janeiro. Na sede da Sociedade de Medicina e Cirurgia do Rio de Janeiro, 147 médicos deram início à nova associação, cuja principal motivação consistia em “ocupar-se das questões científicas e sociais referentes à esterilidade, à prevenção e sequela de abortos, à anticoncepção e à assistência à maternidade sob todos os aspectos”. O primeiro estatuto referente ao tema foi aprovado quatro meses depois, em 30 de abril de 1948, com o propósito de “estimular o estudo da esterilidade entre os especialistas nacionais e incentivar a criação de clínicas nos hospitais e serviços médicos do país”. Em 1974, durante um grande

congresso que reuniu 50 dos mais renomados médicos pesquisadores da reprodução humana realizado na cidade do Rio de Janeiro, a SBE mudou o seu estatuto e passou a ser denominada Sociedade Brasileira de Reprodução Humana (SBRH). A partir daí, ganhou representatividade nacional e esboçou a possibilidade de migrar do Rio de Janeiro para outros Estados. (PEREIRA, 2011).

Paralelamente a esse cenário de avanços no Brasil, o primeiro registro de sucesso da FIV aconteceu na Inglaterra em 1978, com nascimento do primeiro “bebê de proveta”, após nove anos de registros de tentativas sem sucesso de fertilização in vitro do embrião (STEPTOE & EDWARDS, 1978). Em 1984 foi tornado público o primeiro documento ético sobre a RA, originado de um ciclo de debates entre médicos, biólogos, psicólogos e filósofos membros de uma comissão convocada pelo Parlamento inglês, em 1982. O trabalho dessa comissão foi publicado poucos anos mais tarde, sob a forma de um relatório e tornou-se referência histórica na área da bioética, sobretudo para os países europeus (UK, 1984).

No Brasil, o médico Milton Nakamura foi o primeiro brasileiro a ter sucesso no procedimento de FIV o que resultou no nascimento de Anna Paula Caldeira, em São José dos Pinhais (Paraná), em outubro de 1984.

Em 1982, o primeiro Laboratório de Reprodução Humana da América do Sul. Em seguida, em 1988, foi criado o Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) No fim da década de 1980 e início da década de 1990 surgiram vários centros de Reprodução Assistida em São Paulo, Curitiba, Salvador, Belo Horizonte, Rio de Janeiro, Porto Alegre e Recife, totalizando mais de 10 clínicas. (PEREIRA, 2011).

2.2. Definição das Técnicas de Reprodução Assistida

O conceito de ausência involuntária de filhos – “childlessness” – (BECKER, 1994) é central para definir o uso das técnicas de RA. O propósito inicial dessa técnica como sendo o tratamento para o “casal infértil” foi substituído pela ideia de que as técnicas objetivam a “correção de falhas nos projetos reprodutivos de pessoas” e não necessariamente o combate a patologias ou problemas. A RA então pode ser vista como uma ferramenta muito mais ampla, e se insere no contexto sociológico de reprodução social portanto no desejo de ter filhos e constituir famílias (LOYOLA, 2005). É importante, ao se falar em RA, definir, classificar e categorizar a infertilidade. Para a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1992), a infertilidade era definida como a não ocorrência de gestação após 24 meses de relações sexuais não protegidas entre um casal. Após o surgimento da RA esse prazo caiu para 12 meses. A estimativa aponta que entre 8 e 15% da população mundial é “infértil” (SOUZA, 2008). Vale ressaltar que esse intervalo é amplo e sob ele há categorias que variam de forma significativa.

A reprodução assistida possui como aspecto principal auxiliar mulheres ao obter o sucesso de uma gravidez. Ela pode ser obtida por técnicas denominadas de baixa complexidade como a inseminação intrauterina ou o coito programado após acompanhamento com ou sem indução da ovulação (CORRÊA, 1997). Já as técnicas de alta complexidade envolvem técnicas mais refinadas como a fertilização dos oócitos em gotas de meio de cultivo (fertilização in vitro) ou a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), no qual somente um espermatozoide é injetado no citoplasma de um oócito. Uma série de outras técnicas estão associadas a alta complexidade para garantir o sucesso do desenvolvimento embrionário e a garantia de uma gravidez saudável (LEESE et al., 1998).

Rapidamente foi possível constatar que o desejo de ter filhos, não depende de achados clínicos e patológicos em casais. Mais do que isso, esse desejo tem força suficiente para dar início a uma forte demanda por

reprodução: realizar o desejo de homens e mulheres de ter filhos e formar uma família (HARDING 1986; IACUB, 1999; STRATHERN, 1993).

2.3. Transferência embrionária

O processo de transferência é feito simplesmente colocando um cateter de silicone estéril na cavidade intra-uterina através do orifício interno do colo do útero. Os embriões são conduzidos e mergulhados nesta cavidade e, espera-se que o processo de implantação ocorra dentro de alguns dias (SEPPALA, 1985).

A quantidade de embriões transferidos para o útero representa atualmente um enorme desafio para a medicina reprodutiva diante da possibilidade de uma gestação múltipla. Esta ocorrência pode gerar problemas maternos, fetais e neonatais como morbidade cardíaca, hemorragia, pré-eclâmpsia, embolismo do fluido amniótico, diabetes gestacional, anemia e hipertensão (LUKE e BROWN, 2007) e baixo peso ao nascimento (UMRANIKAR et al., 2013). Apesar de ser reconhecido que a transferência de um número maior de embriões em mulheres com idade avançada aumenta as chances de gestação (PANDIAN et al., 2013), este procedimento tem sido questionado pelas razões acima.

No Brasil o Conselho Federal de Medicina (CFM) estipulou novas regras relacionadas às técnicas de reprodução assistida descritas na Resolução nº2121/2015. Um dos pontos cruciais é a relação entre a idade da paciente e o número de embriões que podem ser transferidos. O texto da resolução do CFM diz que:

"O número máximo de embriões a serem transferidos para a receptora não pode ser superior a quatro. Quanto ao número de embriões a serem transferidos, fazem-se as seguintes determinações de acordo com a idade: a) mulheres até 35 anos: até 2 embriões; b) mulheres entre 36 e 39 anos: até 3 embriões; c) mulheres com 40 anos ou mais: até 4 embriões; d) nas situações de doação de óvulos e embriões, considera-se a idade da doadora no momento da coleta dos óvulos."

Adicionalmente, elevadas taxas de anormalidades cromossômicas fetais são encontradas em gestações múltiplas. Em uma gravidez de gêmeos dizigóticos o risco de um dos fetos ser aneuploide é aproximadamente duas vezes maior que em uma gestação única (GARDNER & LANE, 2008). A gestação múltipla também gera um incremento financeiro no custo de todo processo, principalmente quando partos prematuros acontecem e os recém-nascidos demandam longos períodos em unidades de tratamento intensivo (UTIs) neonatais. Grande parte dos problemas normalmente associados à RA está, na verdade, associada aos nascimentos múltiplos (GERRIS & De NEUBOURG, 2005).

Dentro desse panorama, a obtenção de embriões de melhor qualidade e em estágios mais desenvolvidos permite que se transfira um número menor de embriões, o que reduz a ocorrência de uma gestação múltipla (SOGIMIG, 2012). A transferência única de embrião é a tendência estimulada pela medicina reprodutiva para os próximos anos e é um objetivo a ser perseguido como linha de pesquisa para a RA humana (Figura 1).

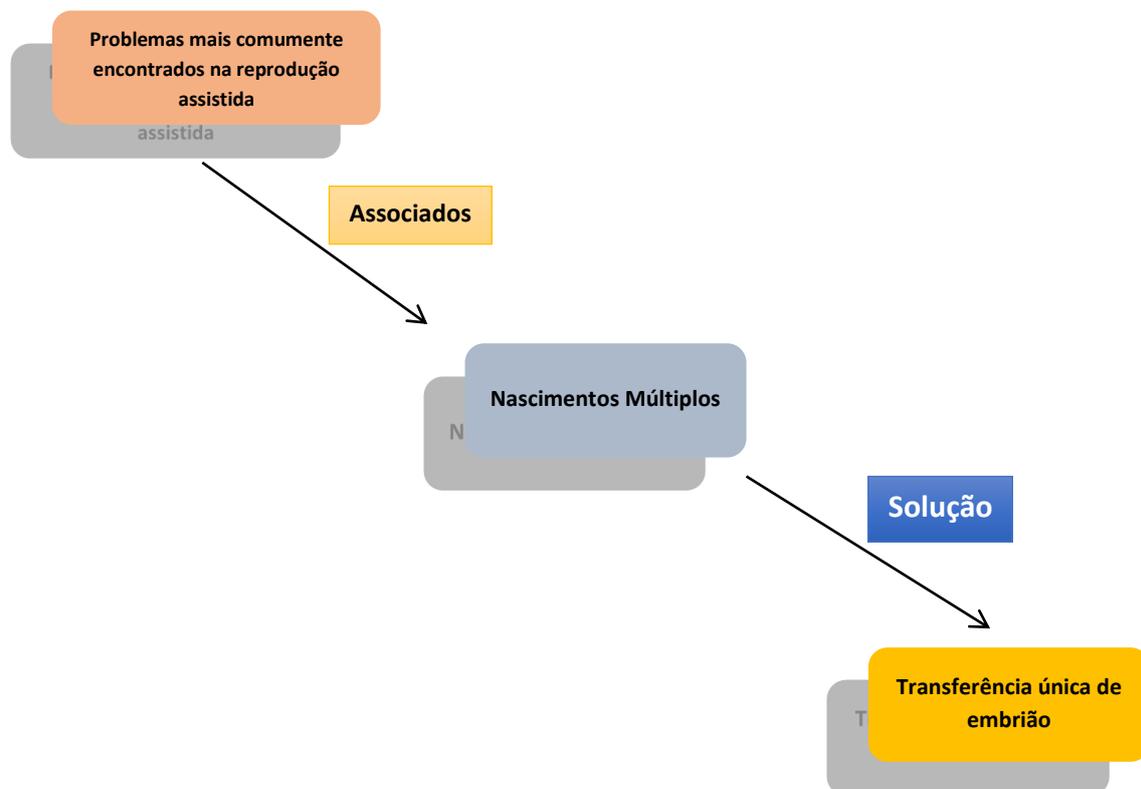


Figura 1: Necessidade da transferência única de embrião parece ser uma ótima solução para prevenir problemas materno-fetais produzidos por gestações múltiplas. Diagrama do autor.

Para se alcançar a transferência única de embrião também é fundamental o aperfeiçoamento dos métodos de avaliação embrionária. A medicina reprodutiva laboratorial pode melhorar a qualidade dos embriões, necessitando incremento nas técnicas de avaliação. O método tradicional para avaliar a viabilidade do embrião é a avaliação morfológica (RIJINDERS & JANSEN, 1998) que utiliza critérios subjetivos pois as avaliações baseiam-se no número, simetria e grau de fragmentação de blastômeros do embrião. Nos últimos anos novos métodos de avaliação foram desenvolvidos e utilizam registros fotográficos dos embriões em todos os momentos do desenvolvimento (KOVACS, 2014). Mesmo com o uso de modernos equipamentos, os critérios avaliativos desses métodos utilizam unicamente aspectos morfológicos para a avaliação e escolha dos melhores embriões. A avaliação morfológica de forma isolada não consegue detectar anormalidades cromossômicas ou defeitos em processos celulares críticos como a síntese de proteínas, e do metabolismo de transcrição que conseqüentemente impacta a viabilidade do embrião (FADOULA, 2015).

Fatores como a formação e qualidade do endométrio também têm importância no sucesso da RA, mas os problemas envolvendo esses aspectos estão associados aos protocolos de estimulação hormonal. Nesse sentido, a transferência durante um ciclo natural tem sido uma forma de evitar problemas de insuficiência endometrial (EDWARDS, 2007).

As condições de cultivo de embriões humanos, por outro lado, é um dos fatores responsável pelo sucesso na reprodução assistida, que é então representado pelo sucesso taxas de sucesso na implantação e gravidez. Dessa maneira, a composição dos meios de cultivo é constantemente revisadas na busca de condições mais próximas possíveis do meio tubário e uterino (MENEZO et al., 1999).

Seguindo essa linha, a definição de “embrião de qualidade” (sob critérios morfológicos, celulares, moleculares e genéticos) também necessita ser definida uma vez que os novos meios de cultivo devem focar na produção de

embriões com estas características.

2.4. Meios de cultivo embrionários

O cultivo embrionário é uma etapa fundamental no processo de FIV. Desde o surgimento da FIV, novas tecnologias aliadas a diferentes formulações de meios e sistemas de cultivo têm sido empregadas para o desenvolvimento de um embrião mais morfológica e geneticamente viável (SUNDE et al., 2016).

Estudos realizados com embriões no período pré-implantação foram iniciados na década de 1950, com o desenvolvimento de camundongos até o estágio de blastocisto cultivado em meios bioquimicamente simples (WHITTEN, 1957). Na última década, houve um acréscimo substancial de conhecimento sobre a fisiologia, bioquímica, genética e controle epigenético dos embriões de mamíferos, incluindo vários estudos realizados diretamente sobre o embrião humano (BAVISTER, 1995; VELKER et al., 2012). Esse avanço no conhecimento dos fatores associados a pré-implantação do embrião levou a mudanças significativas na filosofia de cultivo embrionário, e como resultado, novos meios de cultivo foram desenvolvidos e passaram a ser utilizados nas clínicas de fertilização in vitro (LANE e GARDNER, 2007). Esses novos meios geraram condições nos quais os embriões devem se adaptar e ser capazes de sintetizar componentes essenciais não fornecidos pelo meio e se moldar às condições anormais impostas pelo ambiente artificial, se adaptando também ao estresse osmótico (GARDNER & LANE, 1998; VAJTA et al., 2010).

Todas as relações entre o embrião e o meio ambiente tubário e uterino no período pré-implantacional ainda não são conhecidas (LANE e GARDNER, 2007). Desta forma, torna-se um desafio complexo criar um ambiente artificial para o cultivo embrionário quando ainda não se conhecem em sua totalidade as demandas do embrião. Para que a transferência de um único embrião possa ser adotada como procedimento padrão, será necessário conhecer todas as relações fisiológicas entre o embrião e o ambiente materno e desenvolver meios e sistemas que simulem esta interação in vitro (LEESE et al., 1998).

Existe uma série de fatores que necessitam ser reconhecidos para chegar à transferência única de embriões. Basicamente, é necessário que a

qualidade dos embriões gerados seja a melhor possível. Para isso, um melhor conhecimento das demandas dos embriões é necessário juntamente com uma simulação mais precisa do ambiente uterino. Desta forma, meios mais refinados são gerados e conseqüentemente melhores condições de cultivo são obtidas (Figura 2). Paralelamente, é necessário desenvolver novas técnicas de avaliação e seleção do embrião que será transferido.

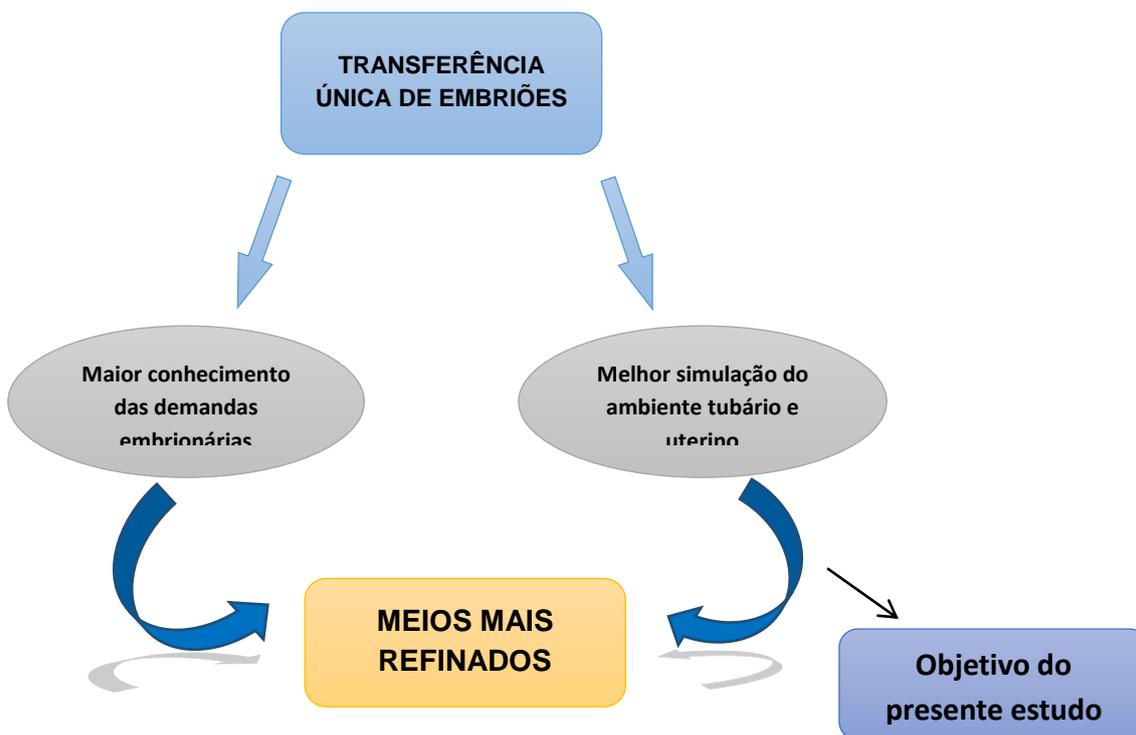


Figura 2: Como alcançar a transferência única de embrião? É de enorme importância conhecer as diversas demandas nutricionais e metabólicas dos embriões e relacionar com o microambiente produzido em laboratório para que os resultados sejam substanciais. Diagrama do autor.

É importante enfatizar que o controle do desenvolvimento embrionário no cultivo *in vitro* é dependente de inúmeras variáveis relacionadas a fatores internos (modificações morfológicas que ocorrem desde a fertilização até o momento da implantação ou mesmo durante a criopreservação do embrião) e a fatores externos (estresse, modificações no microambiente, operador dependente, sinalização celular, temperatura, pH e outros). Todos estes fatores necessitam ser compreendidos e considerados nas formulações de meios de cultivo, que necessitam estar definidos com suas composições conhecidas,

devido a sua influência direta e significativa nos resultados e no sucesso da FIV (GARDNER e LANE, 1998).

2.5. Meios de cultivo sequenciais e contínuos

A classificação dos meios de cultivo em sequenciais (1) e não sequenciais (ou contínuos) (2) é um critério adotado nos últimos anos e apoiado pela crescente evidência de mudanças nos requerimentos e utilização dos nutrientes pelos embriões no decorrer do desenvolvimento. Estes dois tipos de meios têm sido utilizados a fim de adequar as condições do ambiente dos de embriões in vitro as suas demandas múltiplas em cada etapa do desenvolvimento (GARDNER e LANE, 1998).

O cultivo sequencial é uma abordagem conhecida como "de volta à natureza" e baseia-se na troca do meio da placa de cultivo durante o estágio de clivagem, o que geralmente acontece no 3º dia de desenvolvimento in vitro (LESSE, 1998). Esta troca é realizada para evitar a exposição do embrião ao acúmulo de amônia a partir da quebra de aminoácidos e outros metabólitos altamente prejudiciais ao embrião (LANE & GARDNER, 2005).

A segunda é uma abordagem chamada de "deixar que o embrião escolha" ou método de cultivo contínuo, baseia-se na manutenção dos embriões até estágio de blastocisto em um mesmo meio (BIGGERS, 1998). Esta estratégia reduz o potencial de perda embrionária e a contaminação por problemas de manipulação, diminui o estresse embrionário, a redução da temperatura, as altas variações de pH, além de reduzir os custos dos insumos usados (XIE, et al., 2007).

A escolha do meio de cultivo mais apropriado está relacionada ao impacto causado na fisiologia do embrião e ao conhecimento prévio de suas bases metabólicas (LANE & GARDNER, 2007).

2.6. Componentes dos meios de cultivo

Meios para cultivo de embriões humanos são geralmente colocados em placas de poliestireno, em gotas com um volume de 10 - 80 µL cobertas por

óleo mineral estéril, e em seguida, colocados em estufas com uma mistura de oxigênio (O₂) em concentração de 5% á 20% e dióxido de carbono (CO₂) em concentração de 5% e temperatura constante de 37° C (RIEGER et al., 2007). Existem diferentes meios de cultivo disponíveis para cultivo in vitro de embriões humanos, e para entender as suas diferentes formulações é essencial conhecer a função de cada um de seus componentes (VAJTA et al., 2010).

O complexo metabolismo embrionário está completamente dependente do genoma materno até o estágio de quatro células (LEESE et al., 1993). Nesta fase, o consumo de glicose é restrito a baixos níveis e o ideal é que os meios de cultivo respeitem esta baixa demanda. O piruvato é a única fonte de energia utilizada pelo embrião na primeira divisão mitótica e, portanto, é essencial para o desenvolvimento no período imediatamente após a fecundação. Esse composto é então oxidado diretamente pelas mitocôndrias embrionárias por meio da fosforilação oxidativa para obter ATP (BIGGERS et al., 1998). Após o estágio de duas células, os embriões de algumas espécies já são capazes de utilizar o lactato, via atividade da enzima lactato desidrogenase, como fonte de energia (VAJTA et al., 2010).

A partir do estágio de 8 células, as vias metabólicas que permitem a utilização da glicose já são possíveis, uma vez que o genoma embrionário está ativado (LEESE et al., 1998). É possível detectar um maior consumo de glicose durante compactação e no estágio de blastocisto, cuja massa celular interna é inteiramente dependente da glicólise para produção de energia (GARDNER & LANE, 2008).

Essas diferenças nos padrões de absorção de carboidratos espelham a concentração de nutrientes disponíveis no oviduto e útero. As concentrações de piruvato e lactato são mais elevadas no oviduto enquanto a concentração de glicose é reduzida. Situação inversamente observada, no útero (LEESE et al., 1993).

Aminoácidos essenciais e não essenciais são normalmente adicionados ao soro ou adicionados via suplementação em meios de cultivo isentos de soro. O benefício da adição de aminoácidos no meio de cultivo para o desenvolvimento do embrião durante a pré-implantação inclui: sua utilização

como precursores na biossíntese de proteínas, e como fontes de energia e nitrogênio para as células, seu papel como sinalizadores celulares e reguladores do metabolismo energético e da osmolaridade, sua atuação como tampão do pH intracelular e como antioxidantes e quelantes de metais pesados (LANE & GARDNER, 2007). A demanda de aminoácidos pelo embrião varia com a fase de desenvolvimento e com as necessidades metabólicas em cada estágio (STEEVES & GARDNER, 1999).

Em condições normais de cultivo, a temperaturas próximas aos 37°C, os aminoácidos, especialmente a glutamina, sofrem quebras espontâneas formando subprodutos como a amônia. Os efeitos da amônia sobre embriões diminuem a viabilidade dos blastômeros, o desenvolvimento de blastocistos e a capacidade de implantação (GARDNER & LANE, 1993). Atualmente a glutamina tem sido substituída por formas mais estáveis de di-peptídeos como a alanil-glutamina e glicil-glutamina, minimizando os níveis de produção de amônia (GARDNER & LANE, 1993).

O embrião pré-implantação é exposto a uma variedade de macromoléculas no trato reprodutivo feminino, entre elas a albumina e ácido hialurônico (LEESE et al., 1998). Por conta disso, os meios de cultivo são usualmente suplementados com uma fonte proteica em concentrações entre 5 e 20%. A suplementação mais comum inclui as proteínas soro-albumina, soro-albumina humana recombinante e o ácido hialurônico que fornecem importantes fatores benéficos ao desenvolvimento embrionário, como aminoácidos e vitaminas (LEESE et al., 1998). A albumina é a macromolécula mais abundante no trato reprodutivo feminino. No meio de cultivo, tem como principal função eliminar o efeito tóxico associado a pressão osmótica coloidal presente no cultivo embrionário e impedir a aderência dos embriões às placas de cultivo (GARDNER, 2008).

As vitaminas, por sua vez, são importantes por atuar como agentes antioxidantes e ajudam a evitar perda na respiração e controle metabólico (VAJTA, 2010). Componentes como o ácido ascórbico, a cianocobalamina, o ácido fólico e o tocoferol reduzem o dano oxidativo no cultivo embrionário e favorecem a taxa de formação de blastocisto (LANE & Gardner, 2007).

O ácido etileno de amônio tetracético (EDTA), caracterizado por ser um agente quelante de metais divalentes como cálcio e ferro, atua na diminuição do estresse oxidativo, sendo importante nos estágios iniciais de desenvolvimento. Após ligação com EDTA os íons metálicos permanecem em solução, mas exibem reatividade reduzida (LANE & GARDNER, 2007). Em contrapartida, existem íons cuja presença é essencial da formulação de um meio de cultivo embrionário, com destaque para sódio, potássio, magnésio, cloreto e lactato e também a glicina, que atua como um tampão intracelular. O cálcio, por exemplo, participa da compactação celular e é um importante sinalizador celular. O cálcio também participa da regulação dos diversos processos intracelulares como a reativação do oócito no término da segunda meiose e também na ativação do genoma embrionário (TESARIK, 2005).

O equilíbrio do pH é resultado da associação ou dissociação de compostos iônicos e é fundamental para permitir o desenvolvimento embrionário *in vitro*. A faixa de pH ideal para os meios de cultivo está entre 7,2 e 7,4. O pH do meio de cultivo é determinado pela interação entre a concentração de CO₂ e concentração de bicarbonato presente no meio. O pH intracelular em células embrionárias humanas é de 7,2 sendo esse um fator necessário para manter homeostase intracelular (GARDNER et al., 2008)

Fatores de crescimento são componentes que passaram a fazer parte dos meios de cultivo nos últimos anos, à medida que suas funções foram sendo melhor elucidadas. Embriões de mamíferos são naturalmente expostos a fatores de crescimento durante sua passagem na tuba uterina e permanência no útero, os quais desempenham um papel chave no crescimento e diferenciação a partir dos primeiros estágios embrionários (RICTHER, 2008). No entanto, a definição do papel de fatores de crescimento no processo de desenvolvimento pré-implantacional *in-vitro* é ainda pouco conhecida. O blastocisto expressa diversos receptores para diferentes fatores de crescimento, muitos dos quais podem atuar de forma cruzada, o que torna difícil interpretar o efeito de um determinado fator quando adicionado a um meio de cultivo (RICTHER, 2008).

A possibilidade de contaminação dos meios de cultivo de embriões é um fator a ser intensamente evitado. Para se eliminar qualquer possibilidade de infecção antibióticos como gentamicina, penicilina ou estreptomicina são utilizados na proteção contra agentes contaminantes durante o período de cultivo (LEMEIRE et al., 2007).

Como visto o meio de cultivo e seus componentes são essenciais para o correto desenvolvimento embrionário in vitro. Cada componente tem sua função específica e sua utilização adequada depende do conhecimento prévio das demandas embrionárias em cada etapa do desenvolvimento. A figura 3 apresenta possíveis características e ou condições para a produção de um embrião de boa qualidade. Estas demandas/características ainda não são totalmente conhecidas, mas se tornam cada vez mais essenciais para que o meio ideal possa ser desenvolvido.

O trabalho com embriões humanos requer um cuidado intenso. Trata-se da manipulação de células com o potencial de se tornar uma vida humana o que, para algumas culturas, já representa vidas humanas.

É importantíssimo se ater também ao aspecto social que envolve os pais daquela “futura criança”.

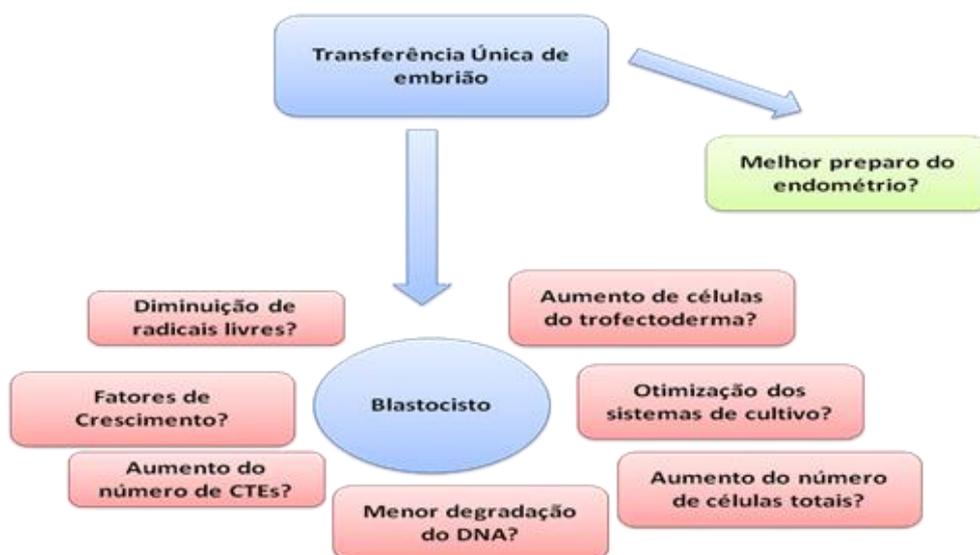


Figura 3: Possíveis fatores associados à produção de um blastocisto de maior qualidade. Um maior sucesso na transferência de embrião único está associado múltiplos fatores que se relacionam também com a composição do meio de cultivo. Diagrama do autor.

2.7. Células-tronco embrionárias

O desenvolvimento embrionário pré-implantacional humano consiste da formação de um embrião unicelular denominado zigoto, após a penetração do espermatozoide. Os núcleos do ovócito e do espermatozoide entram em um processo de condensação e formam os pró-núcleos masculinos e femininos. Com a fusão dos prónucleos, processo chamado de singamia, é reestabelecido um único núcleo diploide. A partir deste momento o embrião inicia uma série de divisões denominadas clivagem e a cada divisão o tamanho das células resultantes, chamadas de blastômeros, é reduzida em 25% (EDWARDS & HANSIS, 2005). Ao chegar ao 3º dia de desenvolvimento (6 a 8 blastômeros) a ativação do genoma do embrião é iniciada (BRAUDE et al., 1988). Neste momento junções intercelulares do tipo gap (permitem a comunicação entre as células) são formadas entre os blastômeros. Formam-se também junções de adesão, e entre os blastômeros externos, desenvolvem-se junções de oclusão, que os torna polarizados (BECKER, 1992). Já com o genoma embrionário ativado e com a presença de junções, as clivagens continuam até que tem início o processo de compactação com forte agrupamento entre os blastômeros. O embrião então alcança o estágio de mórula compacta: uma esfera de células achatadas na superfície internamente compactada. Durante este processo formam-se populações celulares com diferentes destinos. As células localizadas mais externamente (futuro trofoblasto) irão contribuir para formação da placenta, e a massa celular interna ou embrioblasto, será precursora das células-tronco embrionárias (CTEs) (BARLOW et al., 1972).

As células-tronco (CTs) podem ser classificadas segundo a potencia em totipotente, pluripotente ou multipotentes. São chamadas de totipotentes as células capazes de individualmente gerar um novo embrião. São totipotentes o zigoto e os blastômeros até o estágio de 4 células. As CTs pluripotentes podem originar todas as células e tecidos que compõe um embrião, mas não conseguem formar um novo embrião. Elas são provenientes da massa celular interna do blastocisto (CT-embrionárias). Finalmente, são classificadas como multipotentes as células que originam apenas um subgrupo de linhagens

celulares, por exemplo, as CT-mesenquimais e neurais (WAGERS & WEISSMAN, 2004.).

As CTEs são consideradas pluripotentes (REUBINOFF et al., 2000). Uma vez isoladas em condições adequadas de laboratório, estas CTEs permanecem indiferenciadas no ambiente laboratorial. Para isso são necessárias condições de cultivo específicas que inibem sua diferenciação como, por exemplo, a adição do leukemia inhibiting factor ao meio (MINAMI, et al., 1996).

Uma vez retirados os fatores que inibem a diferenciação e adicionados fatores que estimulam uma diferenciação específica, estas células modificam sua forma e fisiologia e tem o potencial de multiplicação e formação de novos tecidos. Desta forma, existe uma grande expectativa em relação ao uso terapêutico das CTEs no tratamento de diversas doenças degenerativas que poderiam ser curadas com a formação de novas células saudáveis (LING & NEBEN, 1997).

Existem importantes propriedades relacionadas às CTEs, por exemplo: quando cultivadas in vitro são capazes de autorrenovação ilimitada (Limite de Hayflick), podem ser propagadas em cultura por longos períodos e têm a capacidade de se diferenciar em tipos celulares provenientes dos três folhetos embrionários (VERFAILLE, 2002). O cultivo de células tem como finalidade a multiplicação celular e deve estar em condições adequadas de temperatura e pH, para que possa manter as suas próprias características de desenvolvimento (BAVISTER, 1995).

2.8. Meio de cultivo para células-tronco embrionárias

Existem diversos meios quimicamente definidos e complexos com o intuito de manter a sobrevivência e proliferação das CTEs (FRESNEY, 2010). Os meios de cultivo específicos para estas células devem possibilitar a permanência de tais características por tempo ilimitado em meio artificial sem causar alterações na morfologia ou fisiologia das células. Atualmente há uma ampla variedade de meios de cultivo específicos para CTEs disponíveis no

mercado e neste trabalho avaliamos três destes tipos de meios apresentados a seguir:

1. Stem Macs (StemMACS™ iPS-Brew XF) é um meio de cultura do tipo “xeno-free” destinado a manutenção experimental de células-tronco embrionárias (embryonic stem cells - ESC) e células pluripotentes induzidas (induced pluripotent stem cells – iPSC) em condições “feeder-free”, ou seja, que possam fornecer uma coleção desconhecida de fatores que permitem a manutenção de potencialidade das células tronco. Não há relato na literatura sobre o uso desse meio em cultivo de embriões, porém resultados obtidos em um estudo que avaliou o desempenho deste meio em cultivo de células-tronco pluripotentes humanas (como as células da massa interna dos blastocistos) constatou rápida adaptação destas às condições do meio, com robusta e eficiente expansão celular. Foi possível observar, nesse caso, que o meio Stem Macs manteve as células em um estado altamente pluripotente, com manutenção do cariótipo normal por mais de 20 passagens¹. Trabalhos ainda mais recentes mostram um bom rendimento do meio Stem Macs também na neurodiferenciação (CHEN & WANG, 2017) e na diferenciação de células pluripotentes humanas em cardiomiócitos (Miltenyi Biotec GmbH, 2015). Dados do fabricante sugerem também que o Stem Macs permite uma rápida volta ao estado de pluripotência da cultura após congelamento.

2. O meio experimental E8 (Essential 8™) também é um meio de cultura “xeno-free” and “feeder-free” especialmente formulado para o crescimento e expansão de células-tronco pluripotentes humanas (human pluripotent stem cells - PSCs). Extensivos testes citados pelo fabricante mostraram a capacidade do meio E8 de manter a pluripotência em diversas linhagens de PSCs (Cellular Dynamics International, Inc.). O meio E8 contém somente os oito componentes

¹ Disponível em: https://www.miltenyibiotec.com/upload/assets/IM0009992_PDF Acesso em: maio de 2018.

requeridos para o cultivo de PSCs, e foi desenvolvido para superar os problemas encontrados no uso do meio Mtesr (mTeSR®). Já foi demonstrado experimentalmente que a remoção da albumina bovina ou de qualquer fator de crescimento da composição do meio reduz significativamente o desempenho da cultura (CHEN et al., 2011). Não foram estudados, dada a complexidade dos experimentos, a relação da albumina com cada um dos fatores de crescimento presentes na composição do meio. Entretanto notou-se que a retirada da albumina da composição do meio Mtesr leva a toxicidade de um segundo componente: o β -mercaptoetanol (BME), e foi demonstrado também que na ausência do BME, a albumina não é necessária para o cultivo de iPSCs (CHEN et al., 2011). Por conta disso, o meio E8 foi desenvolvido representando uma alternativa com menos componentes e sem a suplementação com albumina.

3. O meio MTeSR foi descrito como eficiente no cultivo e derivação de iPSCs, contém 18 componentes que são adicionados a uma base de DMEM/F12 sendo suplementado com albumina bovina (BSA) (THOMSON ET AL., 1998).

2.9. Meios para Células-tronco embrionárias em cultivo de embriões

As CTEs são provenientes de blastocistos e são cultivadas em laboratório com sucesso em meios específicos. A formação de blastocisto é uma etapa fundamental no desenvolvimento embrionário realizado nas clínicas de fertilização in vitro. Meios para cultivo de CTEs deveriam capazes de suportar o desenvolvimento embrionário in vitro a partir do zigoto até o estágio de blastocisto Gelber, et al, (2011) realizou o primeiro trabalho para responder esta pergunta. Foi testado o meio ESCM (Embryonic Stem Cell Culture Medium) no desenvolvimento embrionário de camundongos. Os resultados demonstraram que houve uma melhora no desenvolvimento com maiores taxas de divisão celular, cavitação, eclosão e número de CTEs, quando comparadas ao cultivo em KSOM (Simplex Optimized Medium + potassium) que permite que os zigotos superem o bloqueio de duas células e apoie o desenvolvimento in

vitro de várias linhagens de camundongos. O KSOM é um meio que resulta em taxas mais altas de divisão celular e produz maiores rendimentos de desenvolvimento de blastocisto (LAWITTS & BIGGERS, 1993).

Foi observado também que algumas substâncias presentes no meio específico de CTEs estimularam o desenvolvimento in vitro do embrião com crescimento do trofoblasto, sem comprometimento de sua integridade genética e epigenética. Quando os embriões de duas células foram cultivados em meio para CTEs, não houve melhora no desenvolvimento embrionário. Estes resultados sugerem que o meio para CTEs tem o potencial de atender as demandas embrionárias in vitro, porém não em todos estágios embrionários (GELBER, et al, 2011).

O trabalho de Gelber, et al, (2011), juntamente com a presença do Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias (LaNCE) na UFRJ e a construção de um Laboratório de Reprodução Assistida Experimental também na UFRJ estimulou a realização do presente estudo. O LaNCE desenvolveu um meio de cultivo próprio para CTE, o primeiro no Brasil, mas posteriormente decidiu não mais produzir por questões de logística. Gentilmente o LaNCE cedeu os três meios de cultivos para CTEs que serão testados neste estudo com o objetivo de confirmar os resultados obtidos por Gelber, et al, (2011) e gerar mais conhecimento que possam contribuir para o aumento de meios de cultivo disponíveis para a reprodução assistida humana.

3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho de 3 meios de cultivo (StemMACS™ iPS-Brew XF, Essential 8™, mTeSR®) específicos para células-tronco embrionárias humanas no cultivo in vitro de embriões de camundongo.

3.1. Objetivos específicos:

- Avaliar a evolução dos embriões da clivagem até estágio de blastocisto, nos meios selecionados.
- Obter a taxa de formação de blastocistos expandidos e blastocistos eclodidos nos meios testados.
- Calcular a viabilidade econômica do uso destes meios na clínica reprodutiva humana.

4. JUSTIFICATIVA

A tendência crescente na reprodução humana assistida é a transferência única de embriões para evitar nascimentos múltiplos. Para isso é necessário aprimorar a qualidade dos meios de cultivo a fim de se obter embriões viáveis e mais aptos a iniciar a implantação e a gestação de forma normal. Uma vez que as células-tronco embrionárias são formadas no blastocisto durante o desenvolvimento embrionário, meios de cultura usados no cultivo destas células (CTEs) seriam hipoteticamente adequados para suprir as necessidades e permitir o desenvolvimento do embrião.

O Laboratório Nacional de Células-tronco Embrionárias (LaNCE) da UFRJ utiliza diversos meios de cultivo específicos para cultivo destas células. O presente trabalho pretende avaliar se é possível o uso de meios para CTEs no cultivo de embriões de camundongos *in vitro*.

Este trabalho representa uma demanda de medicina reprodutiva humana pela busca do refinamento e otimização do cultivo de embriões em meios de cultura alternativos, abrindo caminho para a utilização de mais uma opção para o desenvolvimento embrionário humano *in vitro* e conseqüentemente a geração de um ser humano saudável.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

Participaram dos procedimentos experimentais camundongos machos e fêmeas da linhagem FVB que geralmente respondem de modo satisfatório a procedimentos de estimulação ovariana com obtenção de um número adequado de óvulos, com 4 a 6 semanas de idade provenientes do Laboratório de Animais Transgênicos (LAT) localizado na BioRio, Rio de Janeiro (RJ). Os animais foram mantidos à temperatura de 22°C em racks individualmente ventilados com período luminoso de 12 horas e água e ração ad libitum (LabGold, Socil). Para a obtenção de embriões, foi promovido o acasalamento entre machos e fêmeas, sendo as fêmeas grávidas mantidas nas condições descritas anteriormente.

De uma amostra de 72 fêmeas, foram coletados 293 embriões em estado de clivagem, divididos igualmente e randomicamente em quatro cultivos. Todos os protocolos experimentais utilizados nesta metodologia obtiveram a aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFRJ, e se encontram sob registro no nº036/17.

5.2. Superovulação das fêmeas de camundongos

As fêmeas foram submetidas a uma estimulação hormonal por meio da injeção intraperitoneal do hormônio eCG (Equine Corionic Gonadotropin) (NOVORMON®) na dosagem de 5,0 UI (Unidades Internacionais) para aumentar o número de folículos ovulatórios produzidos. Ao término de 48 horas foi realizada a administração intraperitoneal do hormônio hCG (Human Corionic Gonadotropin) (VETECOR®) na dosagem de 5,0 U.I a fim de se alcançar o pico na produção de hormônio luteinizante (LH) e o estímulo da ovulação.

Após a segunda injeção com hCG, as fêmeas eram transferidas para as gaiolas dos machos para permitir a cópula. Na manhã seguinte observou-se a presença do tampão vaginal, indicativo da presença de sêmen coagulado no orifício vaginal e, portanto, evidência da cópula. A manhã em que ocorre a

observação do tampão vaginal foi definida como dia 0,5 pc (pós coito). A tarde deste primeiro dia é classificada como dia 1,0 pc, enquanto a manhã seguinte é o dia 1,5 pc e assim por diante (NAGY, et al., 2003).

5.3. Coleta dos embriões em estágio de duas células

Após 40 a 42 horas da administração do hCG (1,5/2,0 pc) foi realizada a coleta dos embriões em estágio de duas células. Para a coleta dos embriões, as fêmeas foram eutanasiadas por inalação de CO₂ em câmara apropriada e seguindo a regulamentação do biotério. Posteriormente à eutanásia, em capela de fluxo laminar, foi realizada a assepsia da cavidade abdominal. Foi realizada uma incisão na pele e posteriormente na camada peritoneal e muscular. Com auxílio de uma pinça o intestino foi afastado para acessar as tubas uterinas e ovários. Com uma tesoura e uma pinça, o ovário e a tuba uterina (oviduto) são removidas juntamente com um pedaço pequeno do útero.

Uma vez coletados, o ovário e as tubas uterinas foram colocados em uma placa de petri em gotas de 100 µl com o meio de lavagem tamponado com HEPES (HTF-hepes, Human Tubal Fluid; LifeGlobal®) suplementado com 10% de Serum Substitute Supplement™ (SSS™) (Irvine Scientific®.)

O infundíbulo foi identificado e o conteúdo das tubas foi lavado com auxílio de agulha gengival 30G acoplada a seringa de 1mL (BD) em placas de poliestireno (30 x 100 mm, Ingamed®) contendo meio HTF-hepes.

Os embriões de duas células foram selecionados para participar do estudo baseado em critérios morfológicos. Simetria dos blastômeros, ausência de fragmentação e integridade da zona pelúcida foram considerados na seleção dos embriões. Estes foram sequencialmente transferidos para quatro gotas com 100 µl de HTF-hepes para a liberação das células do cúmulo aderidas à zona pelúcida e para a retirada de debris e sangue ocasional.

Por fim os embriões foram divididos aleatoriamente entre os meios testados.

5.4. Cultivo embrionário nos meios experimentais

Após coleta e seleção, os embriões foram divididos randomicamente e transferidos para gotas de 50 µl em placas (15 x 35 mm, Ingamed®) contendo o meio controle e experimentais.

Foram testados três meios experimentais:

- Essential 8 Basal Medium (Thermo Fisher Scientific),
- mTeSR™1 Basal Medium (STEM CELL Technologies)
- Stem Macs ips Brew Human XF (Miltenyi Biotec),

Estes meios foram suplementados de acordo com recomendações específicas do fabricante.

Essential 8 Basal Medium suplementado com Essential 8 supplement, mTeSR™1 Basal Medium suplementado com mTeSR™1 5X Supplement e Stem Macs ips Brew Human XF Basal Medium suplementado com Stem Macs ips Brew supplement. Como controle, foi usado o meio comercial produzido no Brasil GV Blast (Ingamed)™, suplementado com SSS (Irvine Scientific™).

Todas as gotas foram cobertas em óleo mineral (IRVINE SCIENTIFIC®) para cultivo o embrionário, preparadas para estabilização e por fim, colocadas na incubadora de CO₂ (THERMO Scientific) em atmosfera de 5% de CO₂ a uma temperatura de 37° C e umidade acima de 80%.

Os embriões dos grupos controle e experimental foram cultivados em sistema contínuo por cerca de 72 a 80 horas até a chegada ao estágio de blastocisto eclodido quando foi considerado o fim do cultivo embrionário e do experimento.

5.5. Avaliação dos embriões

A avaliação do desenvolvimento embrionário ocorreu 72 a 80 horas após o início do cultivo e foi realizada em microscópio de luz (Nikon®, Tokyo, Japan) com ampliação de 20x.

Foi registrada a formação de blastocistos, blastocistos expandidos e eclodidos. A avaliação morfológica dos embriões que atingiram o estágio de blastocisto considerou três parâmetros: cavitação, expansão e eclosão do blastocisto. Sendo assim os embriões foram caracterizados da seguinte forma: Blastocisto inicial (Bi), Blastocisto expandido (Bexp) e Blastocisto eclodido (Becl).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas usando teste de chi-quadrado para comparação de proporções. Os resultados foram expressos como porcentagens onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

7. RESULTADOS

No total, 293 embriões em estágio de duas células foram distribuídos aleatoriamente e cultivados nos meios GV-Blast (controle) (n=73), E8 (n=73), Mtesr (n=73) e Stem Macs (n=74). Destes um total de 194 embriões evoluíram para o estágio de blastocisto (66,2%) e 149 tiveram expansão da blastocele (51%) a partir do cultivo contínuo.

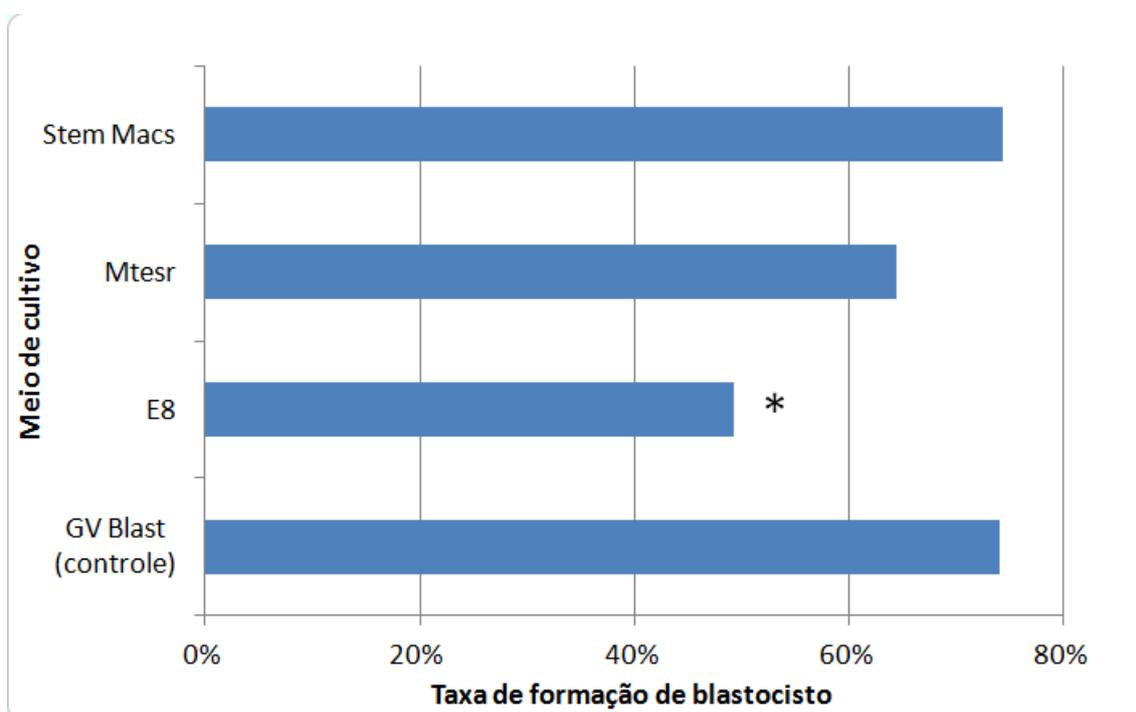


Figura 4. Taxa de formação de blastocistos com embriões de camundongo cultivados a partir do estágio duas células nos meios Stem Macs, Mtesr, E8 e GV Blast (controle). * indica taxa de blastocisto significativamente diferente das outras taxas ($P < 0,05$).

O meio E8 apresentou uma menor taxa de formação de blastocisto comparados aos meios Mtesr e Stem Macs e ao controle GV Blast (74,7, 49,3, 64,4 e 74,0% para GV Blast, E8, Mtesr e Stem Macs, respectivamente, $P < 0,05$, figura 4). Já os meios para células-tronco embrionária Mtesr e Stem Macs tiveram taxas de formação de blastocisto semelhantes ao meio controle GV Blast.

A taxa de formação de blastocisto expandido ou eclodido (Figura 5A) foi calculada a partir do número inicial de embriões de duas células (Figura 5B) e a partir do número de blastocistos formados.

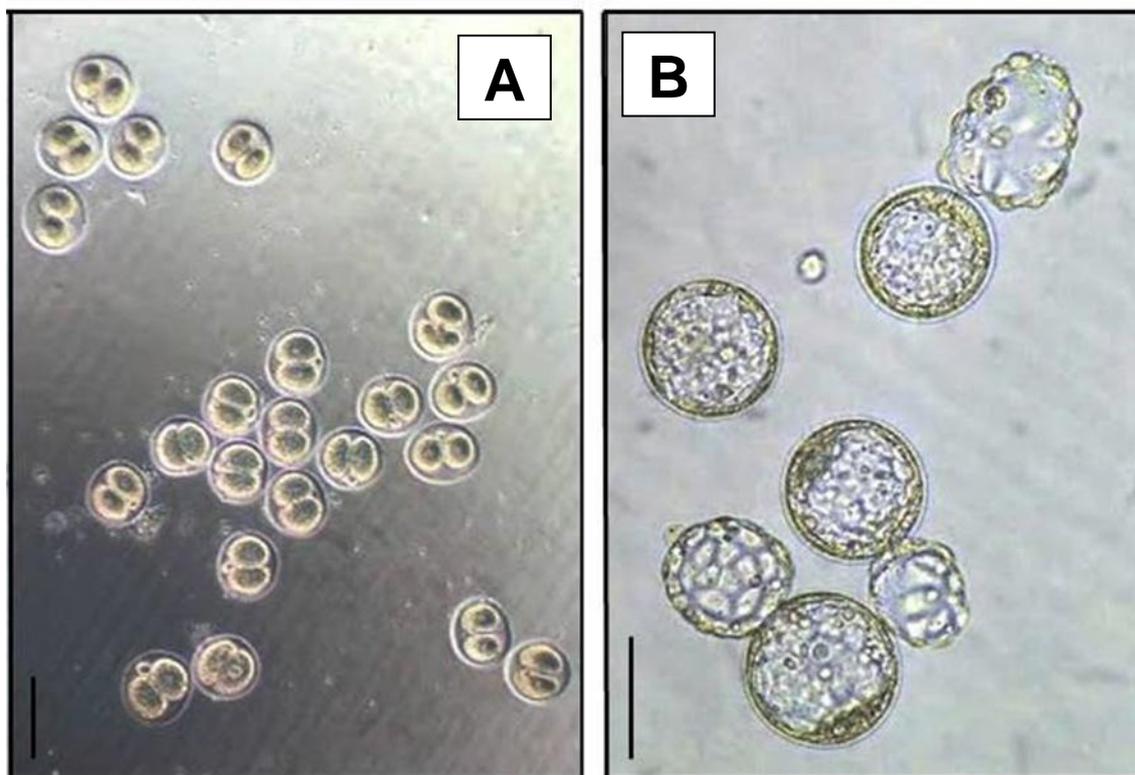


Figura 5: Embriões em estágio de clivagem (2 células) (A) foram colocados em cultivo em meios apropriados para células-tronco embrionária e meio GV Blast como controle. Embriões em estágio blastocistos expandidos e eclodidos (B) ao fim do período de cultivo. Barra = 100 μ m.

O meio E8 apresentou eficiência reduzida na formação de blastocisto comparado aos outros meio quando analisado em função do número de embriões de duas células (58,9%, 31,5%, 49,3% e 63,5% para GV Blast, E8, Mtesr e Stem Macs, respectivamente, $P < 0,05$ (Figura 5A) e quando analisado em função do número de blastocistos (79,6%, 63,9%, 76,6% e 85,5% para GV Blast, E8, Mtesr e Stem Macs, respectivamente, $P < 0,05$, (Figura 5B).

Os meios Mtesr e Stem Macs apresentaram taxas de formação de blastocisto e formação de blastocisto expandido semelhantes ao meio GV Blast utilizado como controle neste estudo.

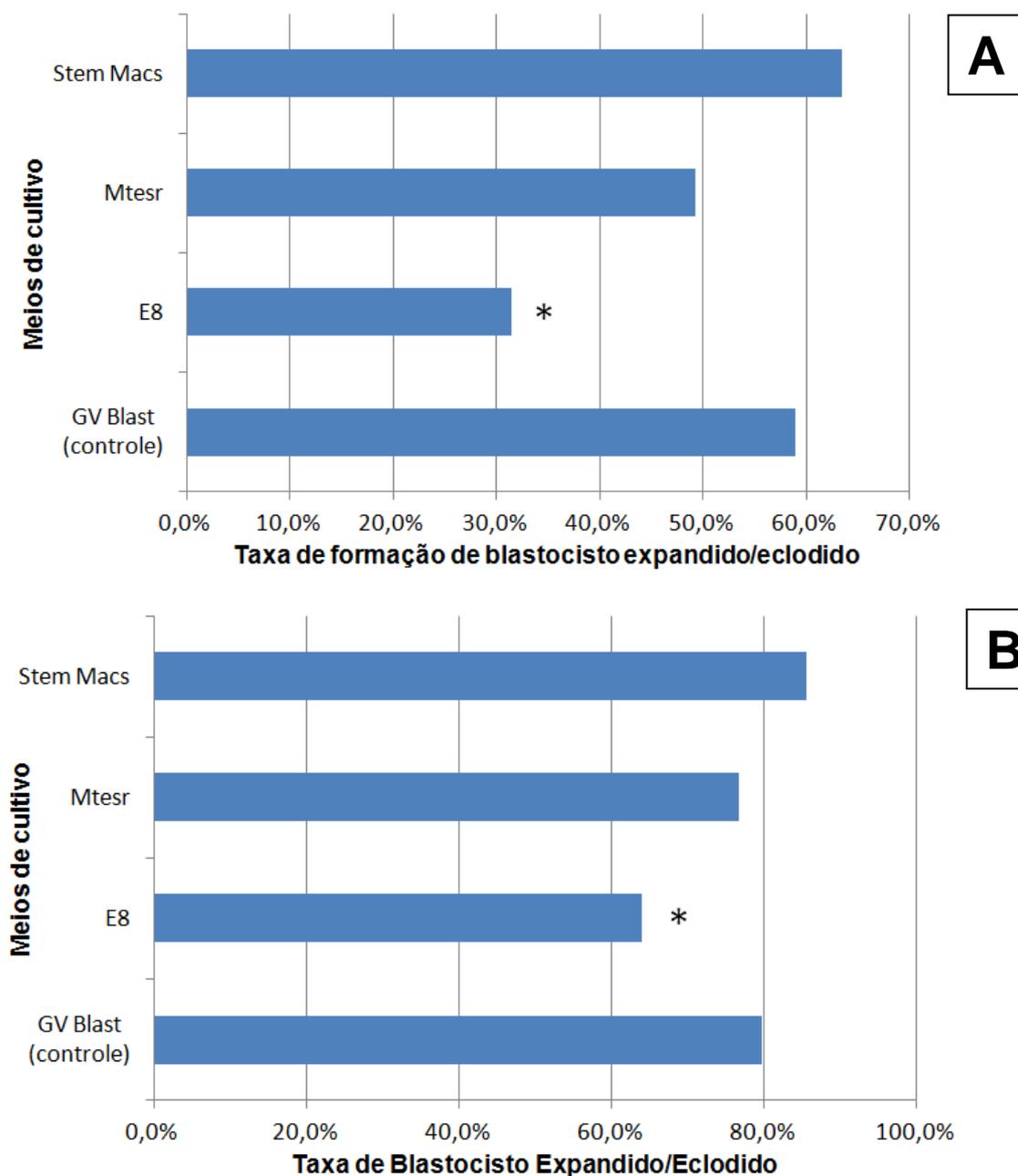


Figura 6. Taxa de formação de blastocistos expandido/eclodido com embriões de camundongo cultivados a partir do estágio duas células nos meios Stem Macs, Mtesr, E8 e GV Blast (controle). Figura 6A, taxas calculadas a partir do número de embriões de duas células que iniciou o cultivo. Figura 6B, taxas calculadas a partir do número de embriões que chegou até o estágio de blastocisto. * indica taxa de blastocisto significativamente diferente das outras taxas ($P < 0,05$).

7.1 Custos dos meios Testados

Foi realizado levantamento de custo unitário de cada um dos 3 meios utilizados neste experimento, assim como do meio controle em um protocolo de rotina de cultivo embrionário em um centro de reprodução assistida com as devidas adequações e regulamentações, conforme demonstrado na tabela 3.

Tabela 1: Estimativa de custo dos meios de cultivo testados (Stem Macs, E8 e MTeSR) se usados na rotina da clínica de reprodução assistida.

	Preço por ml (R\$)	Por caso (5 ml) (R\$)	Suplemento 10% soro 175,00/10 ml (0,5 mL) (R\$)	Total (R\$) (REF.)
GV Blast – Ingamed R\$299,00/30 ml	9,96	49,83	8,75	58,58 (Ingamed)
Stem Macs ips Brew Human XF R\$984,55/500ml –	1,96	9,84	Já vem incluído no kit	9,84 (Milteny ibiotec)
Essencial 8 (E8) R\$958,50/500ml	1,917	9,58	Já vem incluído no kit	9,58 (Thermo)
MTeSR R\$2157,00/500ml	4,31	20,50	Já vem incluído no kit	20,50 (Science Pro)

8. DISCUSSÃO

Embriões dependem do meio de cultivo para seu desenvolvimento in vitro e a ciência tem sempre buscado produzir meios que melhor simulem o ambiente útero-tubário. Este trabalho segue esta linha ao investigar se os meios utilizados no cultivo de células-tronco embrionárias seriam também capazes de proporcionar condições adequadas para o cultivo de embriões humanos. Para responder esta pergunta, estes meios foram testados em um modelo animal murino de desenvolvimento embrionário.

A otimização e a busca por melhores resultados nas técnicas de reprodução humana assistida são metas importantes para o sucesso da implantação e o desenvolvimento de embriões saudáveis. No entanto, as pesquisas médicas com embriões humanos esbarram em extensos dilemas éticos e torna-se necessária a escolha de um modelo experimental alternativo e suficientemente representativo. Avanços ocorreram nas técnicas de cultivo de embriões humanos nos últimos 30-40 anos sendo sempre precedidos e apoiados por pesquisas com embriões de roedores e espécies domésticas (BAVISTER; 1988). O modelo murino muito contribuiu para aperfeiçoar meios e protocolos de cultivo embrionário melhorando os resultados com relação ao desenvolvimento embrionário (SMITH; 2012).

Mudanças na utilização de componentes do meio seguem padrões semelhantes em camundongos e humanos (GARDNER; 2017). Similaridades metabólicas entre as duas espécies permitem que o modelo murino seja um bom padrão para estudar qual a composição do meio de cultivo deve ser utilizada desde a fertilização e pré-implantação até o estágio de blastocistos expandidos (QUINN & HORSTMAN, 1998).

O modelo murino é o mais utilizado para a o controle de qualidade dos meios de cultivo e testes de toxicidade de materiais rotineiramente utilizados para fertilização in vitro humana (MORBECK, 2017). Ele permite a detecção de fatores que podem produzir consequências adversas ao desenvolvimento de embriões humanos in vitro e oferece uma oportunidade para determinar condições ótimas de cultura. (ACKERMAN et al., 1984).

Primates não humanos são naturalmente os que tem embriões mais semelhantes aos dos humanos, mas devido a questões éticas seu uso é limitado. Entre os animais domésticos, os suínos apresentam um embrião com características bem próximas com a do homem (VAJTA et al., 2010). Apesar de não ser o mais parecido entre as espécies domésticas, os embriões de camundongo são semelhantes o suficiente para modelar o desenvolvimento embrionários humano. Muito do que é utilizado nas técnicas de reprodução assistida humana foi desenvolvida em camundongos e atualmente normas internacionais exigem que um meio de cultivo de embriões humanos seja testado em camundongos com uma taxa mínima de 80% de blastocisto para que seja liberado para uso nas clínicas (MORBECK, 2017). Portanto, a escolha do modelo murino, como no presente trabalho, é uma importante ferramenta no monitoramento das condições do cultivo embrionário humano.

As linhas de pesquisa que tem como objetivo a elaboração de novos meios de cultivo de embriões humanos, deve sempre considerar o fato de que a composição desses meios pode ter influência na qualidade dos embriões gerados, no sucesso da implantação, nas taxas de gravidez (MANTIKOU et al., 2013) e em características humanas ainda não totalmente conhecidas como imprinting (KATARI et al., 2016). Isso torna a pesquisa de novos meios, uma área importante e que deve ser realizada com muito cuidado devido aos efeitos diretos na geração da vida humana.

O GV Blast da Ingamed é o primeiro meio de cultivo para embriões humanos produzido no Brasil e está sendo bastante utilizado nos laboratórios de reprodução assistida com resultados iguais aos meios importados. O controle de qualidade deste meio é realizado no Laboratório de Biotecnologia da Reprodução da Universidade do Vale do Itajai, UNIVALI e cada lote somente é liberado para o uso em humanos após obter taxa de blastocisto de 80% em testes com embriões de camundongo (comunicação pessoal).

O GV Blast possui uma solução tampão em cuja composição destaca-se a presença de: D-glucose, solução de aminoácidos, aminoácidos não essenciais, EDTA, sais inorgânicos e a suplementação com globulina e albumina. A osmolaridade do meio GV Blast varia de 275 a 285mOsm/kg

(Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>). A composição dos meios utilizados de rotina como o GV Blast é muito próxima da que é considerada ideal para o cultivo de embriões humanos até o estágio de blastocisto (SUNDE et al., 2016).

O GV Blast foi utilizado como controle no presente estudo e apresentou uma boa taxa de formação de blastocistos (aproximadamente 74%). Este resultado indica que o nosso laboratório está com as condições necessárias para a realização de testes de desenvolvimento embrionário de forma parecida com o principal laboratório que realiza testes de controle para esta área de atuação no Brasil.

Este trabalho foi idealizado após a publicação por GELBER et al., (2011) sobre o uso de meios de células-tronco embrionárias para cultivo de embriões. Estas células são provenientes da massa celular interna de blastocisto. Portanto, este estudo teve como hipótese que se estes meios são capazes de manter células-tronco embrionárias em cultivo, eles também podem suportar o desenvolvimento de embriões nos estágios pré-implantacionais. Para isto, foram testados três meios comerciais para células-tronco embrionárias: Stem Macs (StemMACS™ iPS-Brew XF), Essential 8™, e mTeSR, gentilmente cedidos pelo professor Stevens Rehen do Laboratório Nacional de Células-Troco embrionárias (LaNCE) da UFRJ.

Os resultados indicam que os meios são capazes de suportar o desenvolvimento embrionário desde o estágio de duas células até a formação de blastocisto. Os meios Stem Macs (74,0%) e MTeSR (64,4%) apresentaram taxas de formação de blastocisto semelhantes ao meio controle GV Blast (74,7%). O meio E8, apresentou uma taxa mais baixa de formação de blastocisto (49,3%), porém ainda sim demonstrou potencial para suportar o desenvolvimento embrionário. De forma geral, os três meios para células-tronco embrionária demonstraram potencial para manter embriões pré-implante em cultivo.

O uso do meio ESCM não resultou em um desenvolvimento embrionário semelhante ao meio controle KSOM no trabalho de Gelber et.al. (2011) quando cultivo foi iniciado com embriões de duas células (KSOM - 40% taxa de blastocisto e 60% taxa de blastocisto expandido e ESCM - 50% taxa de

blastocisto e 20% taxa de blastocisto expandido). O cultivo de embriões de duas células em ESCM impediu vários aspectos do desenvolvimento embrionário normal como clivagem, cavitação e eclosão. Diferenças na composição dos meios usados neste estudo com o ESCM usado por Gelber et.al. (2011) podem explicar essa diferença nos resultados. O meio KSOM é o mais indicado para cultivo de embriões murinos (SUMMERS, 2013) e foi usado como controle no estudo de Gelber et.al. (2011). No presente estudo o meio GV Blast, produzido para cultivo de embriões humanos foi usado como controle e proporcionou um bom desenvolvimento. Mas sua composição é diferente do KSOM e pode também ter ocasionado uma diferença nos resultados.

O cultivo a partir do estágio de duas células não resultou em bom desenvolvimento embrionário incluindo diminuição no número de células no blastocisto no estudo de Gelber et.al. (2011). Não foi realizada contagem de células no presente estudo por motivos de logística do projeto.

A expansão do blastocisto e sua consequente eclosão são sinas de boa qualidade embrionária (THOMPSON et al., 2013). Cerca de 50% dos blastocistos chegaram a este estágio durante o presente estudo. O meio E8 apresentou a menor taxa de expansão/eclosão (31,5%). O meio mTeSR apresentou uma taxa abaixo de 50% e os meios Stem Macs e GV Blast apresentaram taxas mais altas (63,5% e 58,9%, respectivamente). Estes dados confirmam o potencial de utilização dos meios para células-tronco embrionárias no cultivo de embriões nos estágios iniciais.

Se considerar somente os embriões que chegaram ao estágio de blastocisto, cerca de 75% destes avançaram para expansão/eclosão. A variação foi de 63,9% no meio E8 para 85,5% no meio Stem Macs.

Gelber et al., (2011) também avaliou a eficiência do meio para células-tronco ESCM quando o cultivo foi iniciado com embriões no estágio 8 células. Nesta situação houve a taxa de formação de blastocistos expandidos foi maior (62%) no meio ESCM comparado ao meio controle KSOM. Portanto, no trabalho de Gelber et al., (2011), o meio para células-tronco utilizado não manteve um desenvolvimento embrionário adequando quando o cultivo foi iniciado com

embriões de duas células, mas ao iniciar em um estágio de oito células, houve um efeito positivo do meio.

Gelber et al., (2011) também obtiveram excelentes taxas de implantação (83,9%) e nascimento de proles euploides (48,1%) após transferência de blastocistos cultivados no meio ESCM. No presente estudo não foram realizadas transferência embrionárias. A transferência dos embriões cultivados e uma avaliação dos filhotes nascidos é fundamental na avaliação do sucesso de um meio de cultivo. Somente resultados de desenvolvimento in vitro contribuem para gerar conhecimento, mas não o suficiente para aprovar a entrada de um novo meio de cultivo no mercado da reprodução assistida humana.

O Laboratório Nacional de Células-Tronco do Rio de Janeiro (LaNCE), produziu e patenteou um meio de cultivo para células-tronco embrionárias chamado BRSTEM (MUOTRI et al., 2011). Esse meio tem uma importância por ser de origem inteiramente nacional e foi produzido por alguns anos, porém posteriormente foi decidido interromper sua produção e dessa forma passaram a usar meios comerciais. O potencial do meio Brstem para cultivar embriões foi testado e os resultados indicaram que as taxas de formação de blastocisto no meio BRSTEM foram adequadas, quando o cultivo foi iniciado á partir do estágio de duas células (SALVADOR et al., 2014)

Em estudo recente foi demonstrado pela primeira vez que o meio específico para células-tronco embrionárias possui fatores de crescimento que poderiam eficientemente estimular a maturação in vitro de oócitos. Esta maturação resultou no posterior desenvolvimento embrionário após fertilização in vitro e nascimentos de filhotes saudáveis após a transferência dos embriões para camundongas receptoras (MIRAKI et al., 2017).

Coletivamente, os resultados dos trabalhos de Gelber et.al. (2011), Salvador et al., 2014 e o presente estudo indicam que os meios utilizados para o cultivo de células-tronco embrionárias têm o potencial para serem utilizados no cultivo embrionário de camundongo e possivelmente no cultivo de embriões humanos. Porém, é importante discutir qual seria a vantagem do uso de um

meio com uma formulação diferente dos meios atualmente usados na embriologia humana.

Um dos pontos desta discussão é saber qual a população celular presente ao blastocisto que poderia ser beneficiada com o cultivo em meios específicos para células tronco. Teoricamente, supõe-se que tais meios favoreceriam maior desenvolvimento da massa celular interna do embrião que formará as células-tronco embrionárias. Estas células são responsáveis pela formação do embrião, mas é necessário identificar a possibilidade de um desequilíbrio celular no blastocisto.

Entretanto, na mesma estrutura embrionária, o blastocisto, existe outra população de células fundamentais para o sucesso da gestação. As células na região externa do blastocisto, conhecidas como trofotoderma são responsáveis pela formação da placenta. A insuficiência placentária contribui efetivamente como uma das principais causas de infertilidade humana (CUFFE et al., 2013).

Portanto, é importante definir se no desenvolvimento de novos meios de cultivo de embriões humanos, o objetivo deve ser um aumento no número de células da massa celular interna, do trofotoderma ou um aumento do número total independentemente do tipo celular.

Nas últimas décadas, os fabricantes de meio de cultura introduziram numerosas mudanças em seus produtos com o objetivo de melhorar as taxas de sucesso da FIV (VAJTA et al., 2010). Os meios utilizados em FIV variam amplamente em sua composição de nutrientes, portanto, para avaliar possíveis efeitos sobre o crescimento embrionário é crucial conhecer a composição do meio a que o embrião está exposto (MORBECK et al, 2014a). O modo pelo qual concentrações variáveis de componentes como substratos energéticos, aminoácidos, EDTA, macromoléculas, fatores de crescimento e a osmolaridade do meio afetam o desenvolvimento embrionário, as taxas de nascidos vivos e quais seriam as implicações desses fatores em longo prazo para a saúde no recém-nascido e posteriormente no adulto não é totalmente conhecido (SUNDE et al., 2016). Entretanto, sabe-se que ao comparar o impacto potencial das formulações de meios de cultura sobre a qualidade do embrião e em seu

epigenoma, duas questões devem ser fortemente consideradas: o tempo e o meio de cultivo (SUNDE et al., 2016).

A medicina reprodutiva tem focado nos últimos anos na busca de melhores embriões para permitir a transferência única e dessa forma evitar as gestações múltiplas (LEE et al., 2016). A seleção do melhor embrião tem sido uma das estratégias empregadas com o acompanhamento do desenvolvimento embrionário em tempo real por meio de equipamentos como timelapse (PRIBENSZKY et al., 2017) ou por identificação de características genéticas que podem interferir no desenvolvimento por meio de testes genéticos préimplantacionais como Fluorescence in situ hybridization, CGH, NGS (WU et al., 2014).

Formular um meio de cultivo que seja cada vez mais parecido com o ambiente tubário-uterino é também uma estratégia para a obtenção de embriões de melhor qualidade. Mas neste caso, é importante definir o que seria um blastocisto com essas qualidades desejadas, levando em consideração sua morfologia e tipos celulares. É importante definir se um blastocisto com mais células é algo que deve ser o objetivo e se há um tipo celular mais importante neste aumento.

O controle de qualidade realizado pelos fabricantes de meios de cultivo é denominado “mouse embryonic assay – MEA” (ACKERMAN et al., 1984; BYERS et al., 2006). Um determinado meio de cultura é aprovado pelo MEA se permitir o desenvolvimento de no mínimo 80% dos embriões até o estágio de blastocisto. Embora esse não seja um protocolo padronizado em parâmetros como: o estágio embrionário inicial do cultivo, a linhagem do animal, o número mínimo de embriões a ser cultivado, a osmolaridade e a suplementação com proteínas é o teste mais aceito. Atualmente não existem alternativas disponíveis que forneçam os mesmos resultados (SUNDE et al., 2016).

O genoma e o epigenoma do embrião são completamente remodelados entre o momento da fertilização e a implantação, o que torna extremamente vulnerável durante a manipulação in vitro e no período de cultura. No estágio de blastocisto, mudanças na alocação de células para as linhagens da massa celular interna e do trofoectoderma e também ocorrem (LONERGAN et al.,

2006). O suprimento de nutrientes pode alterar o tamanho da massa celular interna e do feto, afetar características do trofoectoderma e por consequência o tamanho e a função da placenta, portanto influências diretas nesses fatores afetam o crescimento do feto e seu peso ao nascer (SUNDE et al., 2016).

A composição do meio de cultura pode afetar eventos epigenéticos causando prejuízos no embrião, no recém-nascido e potencialmente, em longo prazo, problemas de saúde no adulto (BEAUJEAN, 2015). Os componentes mais críticos nesse panorama são os nutrientes. Glicose e aminoácidos são particularmente importantes, uma vez que desencadeiam vias reguladoras do crescimento e desenvolvimento através de alterações epigenéticas (CHASON et al., 2011). Embriões cultivados em meios de cultura com baixo teor de nutrientes podem reprogramar o seu metabolismo para um nível mais baixo, o que levaria a um fenótipo de baixo metabolismo em longo prazo (GARDNER, 2017). Esses mesmos embriões, quando no ambiente materno rico em nutrientes, experimentam supercrescimento e o inverso também pode ser observado para embriões cultivados em meio com alto teor de nutrientes (ECKERT et al., 2015; PANTALEON, 2015).

A medicina individualizada é um assunto que tem sido discutido em diversas especialidades (CHAN, 2011). Na medicina reprodutiva não é diferente e tem se percebido que protocolos de estimulação hormonal tem seus resultados influenciados por características individuais de cada mulher (SIGHINOLFI et al., 2017). No desenvolvimento embrionário também tem se observado que cada embrião tem sua preferência por um meio de cultivo (MANTIKOU et al., 2013) e não se deve assumir que existe um meio de cultivo ideal para todos os embriões. Portanto, a disponibilidade de novos meios com composições variadas é algo de interesse da medicina reprodutiva, desde que desenvolvidos com critérios definidos e com a segurança necessária.

Meios de cultivos são produtos comerciais que apresentam composição específica e que gera uma oferta significativa a um mercado específico e rigoroso como o da Fertilização in vitro. Esta área da medicina está em constante busca de novas tecnologias que exigem inovação, alta qualidade e

consequentemente confiabilidade de resultados (NIJSSEN e FRAMBACH, 2000).

Levando em consideração unicamente um protocolo de cultivo embrionário como referência, foi observada uma redução do custo com o uso dos meios testados comparados ao meio controle (GV-Blast). Observa-se uma vantagem em termos de custo. Mas em um cenário de um tratamento de reprodução assistida este custo acaba tornando-se reduzido ou até mesmo irrelevante, levando-se em conta um custo total de tratamento que pode chegar a um valor médio em torno de R\$ 25.000,00 . Em contrapartida, os meios testados apresentaram uma eficiência que poderia sugerir a utilização para um grupo específico de pacientes, pois é interessante que uma maior variedade de meios de cultivo com composições diferentes possam levar ao uso individualizado, assim como se faz em relação às diversas medicações utilizadas para indução da ovulação, bem como variedade de protocolos individualizados.

Atualmente como os meios de cultivo apresentam composições muito semelhantes não existe um tipo de comparação deste nível, mas no futuro talvez seja possível que seja prescrito para uma determinada paciente um protocolo de cultivo específico e mais favorável ao tipo de etiologia de infertilidade apresentada.

Nossos resultados sugerem que os meios para células-tronco embrionárias têm o potencial de suportar o desenvolvimento embrionário em camundongos. Acreditamos que este mesmo suporte no desenvolvimento aconteça se for testado em embriões humanos. Os resultados do presente estudo necessitam ser reproduzidos para confirmar este potencial e novos estudos responderão perguntas surgidas neste estudo. Técnicas como contagem diferencial de células-tronco e trofotoderma responderá se há um aumento destes tipos celulares. A transferência embrionária e o nascimento de filhotes saudáveis é também uma etapa fundamental para confirmar a viabilidade do uso destes meios.

9. CONCLUSÃO

- Todos os meios comerciais para células-tronco embrionárias têm potencial para suportar desenvolvimento embrionário inicial de camundongos.
- O meio E8 apesar de ter este potencial, apresentou taxas de formação de blastocisto menores que controle.
- Os meios Stem Macs e mTeSR apresentaram taxas de blastocisto e blastocisto expandido/eclodido semelhantes ao controle do estudo.
- Meios de cultivo para células-tronco embrionárias poderão ter um custo menor caso seja usado em medicina reprodutiva humana.

10. PRODUTO

O produto do presente trabalho foi a constatação da possibilidade do uso dos meios comerciais para células-tronco embrionárias em embriões de camundongo ou do homem.

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN S, SWANSON R, STOKES G, VEECK L: Culture of mouse preimplantation embryos as a quality control assay for human in vitro fertilization. **Gamete Research banner** v. 9, pp. 145-152, 1984.

BARLOW, P., OWEN, D. A., GRAHAM, C. DNA synthesis in the preimplantation mouse embryo. **Journal of embryology and experimental morphology** v.27, pp.431 – 445, 1972.

BAVISTER, B. D. Culture of preimplantation mammalian embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, nº2, pp.91 – 148, 1995.

BAVISTER, B.D. Animal Models for the Study of Fertilization and Early Development in Vitro. In: Wolf D.P., Bavister B.D., Gerrity M., Kopf G.S. **In Vitro Fertilization and Embryo Transfer**. Springer, Boston, MA, pp. 207-234, 1988

BECKER, D. L., LECLERC-DAVID, C., WARNER, A. The relationship of gap junctions and compaction in the preimplantation mouse embryo. **Development (Cambridge, England). Supplement**, pp.113 – 118, 1992.

BECKER, G. Metaphors in disrupted lives: infertility and cultural constructions of continuity. **Medical Anthropology Quarterly**, v. 8, nº 4, pp. 383-410, 1994.

BEAUJEAN, N. Epigenetics, embryo quality and developmental potential. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, pp. 53-62, 2015.

BIGGERS, J. D. Reflections on the culture of the preimplantation embryo. **The International journal of developmental biology**, v.42, pp. 879 – 884, 1998.

BRAUDE, P., BOLTON, V., & MOORE, S. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. **Nature**, V. 332, pp. 459–461, 1988.

BYERS S, PAYSON S, TAFT R. Performance of ten inbred mouse strains following assisted reproductive technologies (ARTs). **Theriogenology**, v.65, pp. 1716– 1726, 2006.

CHAN IS, GINSBURG GS. Personalized medicine: progress and promise. **Annu Rev Genomics Human Genetics**. v. 12 pp. 217–44, 2011.

CHASON, R. J., CSOKMAY, J., SEGARS, J. H., DECHERNEY, A. H., & ARMANT, D. R. Environmental and epigenetic effects upon preimplantation

embryo metabolism and development. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v.22, nº10, 412–420, 2011.

CHEN, G., et al. Chemically defined conditions for human iPSC derivation and culture. **Nature Methods**, v.8, nº5, pp. 424–429, 2011.

CHEN, X., WANG, G. Performance of StemMACS™ iPS-Brew XF in the maintenance and neural differentiation of human pluripotent stem cells.

StemMACS™ iPS-Brew XF application note, 2017.

CORRÊA, M.C.D.V. A tecnologia a serviço de um sonho. Um estudo da reprodução assistida no Brasil. **Tese (Doutorado em Saúde Coletiva) - Instituto de Medicina Social, Universidade do Estado do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro, 1997.

CORRÊA, M. C.D. V., LOYOLA, M.A. Tecnologias de reprodução assistida no Brasil: opções para ampliar o acesso. *Revista de Saúde Coletiva*, v. 25, nº3, pp. 753-777, 2015

CUFFE, JAMES SM et al. Placental derived biomarkers of pregnancy disorders. **Placenta**, v. 54, p. 104-110, 2017.

ECKERT, J.J., VELAZQUEZ, M.A., FLEMING, T.P. Cell signalling during blastocyst morphogenesis. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v.843, p. 1, 2015.

EDWARDS, R. G. IVF, IVM, natural cycle IVF, minimal stimulation IVF - time for a rethink. **Reproductive biomedicine online**, v.15, pp.106 – 119, 2007.

EDWARDS, R. G., HANSIS, C. Initial differentiation of blastomeres in 4-cell human embryos and its significance for early embryogenesis and implantation. **Reproductive biomedicine online**, v.11, pp.206 – 218, 2005.

FADUOLA, P. Selecting a Single Embryo for Transfer after In-vitro Fertilization: a translational medicine perspective. **Translational Biomedicine**, v. 6, pp. 1-19, 2015.

FRESHNEY, R. Ian. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. **John Wiley & Sons**, 7TH edition, 2015.

GARDNER, D.K., LANE, M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. **Biology of reproduction**, v.48, pp.377 – 385, 1993.

GARDNER, D.K., LANE, M. Amino acids and vitamins prevent culture-induced metabolic perturbations and associated loss of viability of mouse blastocysts.

Human reproduction (Oxford, England), v.13, pp.991 – 997, 1998.

GARDNER, D.K., LANE, M. **Textbook of assisted reproductive technologies**. 3^oed. Informa Healthcare, pp.219 – 239, 2008.

GARDNER, D., KELLEY, R. Impact of the IVF laboratory environment on human preimplantation embryo phenotype. **Journal of Developmental Origins of Health and Disease**, v.8 (4), pp.418-435. 2017.

GELBER, K. et al. A potential use of embryonic stem cell medium for the *in vitro* culture of preimplantation embryos. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v.28, pp.659 – 668, 2011.

GERRIS, J., NEUBOURG, D. D. Single embryo transfer after IVF/ICSI: present possibilities and limits. **The Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v.55, n^o1, pp.26 – 47, 2005.

HARDING, S. The science question of feminism. **Ithaca: Cornell University Press**, 1986.

IACUB, M. Homoparentalité et ordre procreative .Àu dela du PaCS: L'expertise familiale à l'épreuve de l'homosexualité. **Paris: PUF**, 1999.

KATARI S, TURAN N, BIBIKOVA M, ERINLE O, CHALIAN R, FOSTER M, et al. DNA methylation and gene expression differences in children conceived in vitro or in vivo. **Human Molecular Genetics**, v.18, pp. 3769–78, 2009.

KOVACS, P. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v.12, 2014.

LANE, M., GARDNER, D. K. Understanding cellular disruptions during early embryo development that perturb viability and fetal development. **Reproduction, fertility, and development**, v.17, pp.371 – 378, 2005.

LANE, M., GARDNER, D. K. Embryo culture medium: which is the best? **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, v.21, pp. 83–100, 2007.

LAWITTS, JA., BIGGERS, JD. Culture of preimplantation embryos. **Methods Enzymol.**, v.225, pp:153–164, 1993.

- LEE AM, CONNELL MT, CSOKMAY JM, STYER AK. Elective single embryo transfer- the power of one. **Contraception and Reproductive Medicine**. pp. 1:11, 2016.
- LEESE, H. J. et al. Human embryo culture: back to nature. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v.15, pp.466 – 448, 1998.
- LEESE, H.J. et al. Early human embryo metabolism. **BioEssays**, v.15, nº4, pp.259 – 264, 1993.
- LEMEIRE, K., MERRIS, V. V., CORTVRINDT, R. The antibiotic streptomycin assessed in a battery of *in vitro* tests for reproductive toxicology. **Toxicology in vitro**, v.21, pp.1348 – 1353, 2007.
- LING, V., NEBEN, S. *In vitro* differentiation of embryonic stem cells: immunophenotypic analysis of cultured embryoid bodies. **Journal of Cellular Physiology**, v.171, nº1, pp.104 – 115, 1997.
- LONERGAN, P., FAIR, T., CORCORAN, D., & EVANS, A. C. O. Effect of culture environment on gene expression and developmental characteristics in IVF-derived embryos. **Theriogenology**, v.65 (1), pp. 137–152, 2006.
- LOYOLA, M.A. Bioética, reprodução e gênero nas sociedades contemporâneas: uma introdução. Bioética, reprodução e gênero nas sociedades contemporâneas. **Campinas e Brasília: Abep e Letras Livres**, 2005.
- LUKE, B., BROWN, M. B. Contemporary Risks of Maternal Morbidity and Adverse Outcomes With Increasing Maternal Age and Plurality. **Fertility and Sterility**, v.88, nº2, pp.283 – 293, 2007.
- LUDWIG TE et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. **Nature Biotechnology**, v24, nº2, pp. 185–187, 2006.
- MANTIKOU, E. YOUSSEF, M., VANWELY, M. VAN DER VEEN, F., AL-IANY, H. Embryo culture media and IVF/ICSI success rates: a systematic review. **Human Reproduction Update**, v.19, pp. 210-220, 2013.
- MANUAL DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA –SOGIMIG – 5ª edição, 2012.
- MÉNÉZO, Y., et al. Sequential media: why and how? **Contraception, fertilité, sexualité**, v.27, nº6, pp.449 – 451, 1999.

MINAMI, M., et al. STAT3 activation is a critical step in gp130-mediated terminal differentiation and growth arrest of a myeloid cell line. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, pp.3963 – 3966, 1996.

MIRAKI S, MOKARIZADEH A, BANAFSHI O, et al. Embryonic Stem Cell Conditioned Medium Supports In Vitro Maturation of Mouse Oocytes. **Avicenna Journal of Medical Biotechnology**.; v 9(3) pp. 114-119, 2017.

MORBECK, D.E., KRISHER, R.L., HERRICK, J.R., BAUMANN, N.A., MATERN, D., MOYER, T. Composition of commercial media used for human embryo culture. **Fertility and Sterility**, v. 102, pp., 759-766, 2014.

MORBECK, D. Mouse Embryo Assay for Quality Control in the IVF Laboratory. In M. Montag & D. Morbeck (Eds.), **Principles of IVF Laboratory Practice: Optimizing Performance and Outcomes** Cambridge: Cambridge University Press. pp. 69-72, 2017.

MUOTRI, A., MARINHO, P. A. N. ; REHEN, S.K. ; CASTILHO, L. R. . STEM CELL DEFINED MEDIA FOR XENO-FREE AND FEEDER FREE CONDITIONS AND USES THEREOF. **PATENTE WO2011140397**, 2011.

NAGY, A., GERTSENSTEIN, M., VINTERSTEN, K., and BEHRINGER, R. Manipulating the Mouse Embryo, **A Laboratory Manual** (Third edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 0-87969-591-9, 2003.

NIJSSEN, E. J.; FRAMBACH, R. T. Determinants of the adoption of new product development tools by industrial firms. *Industrial Marketing Management*, v. 29, n. 2, pp.121-131, 2000.

PANDIAN, Z., MARJORIBANKS, J., OZTURK, O., SEROUR, G., BHATTACHARYA, S. Number of embryos for transfer following in vitro fertilization or intra-cytoplasmic sperm injection. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, (7):CD003416. 2013.

PANTALEON, M. The role of hexosamine biosynthesis and signaling in early development. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 7, p.p. 843-853, 2015.

PEREIRA, D.H.M. A história da reprodução humana no Brasil. **Revista Feminina**, v.39, nº2, pp.59-64, 2011.

PRIBENSZKY, C., NILSELID, A.-M., & MONTAG, M. Time-lapse culture with morphokinetic embryo selection improves pregnancy and live birth chances and reduces early pregnancy loss: a meta-analysis. **Reproductive BioMedicine Online**, V.35, nº5, pp. 511–520, 2017.

QUINN, P., HORSTMAN, F. Is the mouse a good model for the human with respect to the development of the preimplantation embryo *in vitro*? **Human Reproduction**, v. 13, pp. 173-183, 1998

REUBINOFF, B. E. et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*. **Nature Biotechnology**, v.18, nº4, pp.399 – 404, 2000.

RICHTER, K. S. The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, v.20, pp.292 – 304, 2008.

RIEGER, D., SCHIMMEL, T., COHEN, J., et al. Comparison of GPS and standard dishes for embryo culture: set-up and observation times, and embryo development. **In: Proceedings of the 14th World Congress on IVF and 3rd World Congress on IVM, Montreal**, pp. 1202, 2007.

RIJNDERS, P.M., JANSEN, C.A. The predictive value of day 3 embryo morphology regarding blastocyst formation, pregnancy and implantation rate after day 5 transfer following in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection. **Human Reproduction**, v. 13, p.p. 2869-2873, 1998.

SALVADOR, R. A. **Avaliação do uso de um meio de cultivo de células-tronco embrionárias humanas no desenvolvimento *in vitro* de embriões de camundongo** – 2014. Trabalho de Conclusão de Curso – Associação Instituto Sapientiae – Centro de Estudos e Pesquisa. Curso de Pós-Graduação *Lato-Sensu* em Reprodução Humana Assistida, São Paulo.

SEPPALA M: The World Collaborative Report on In Vitro Fertilization and Embryo Replacement: Current State of the Art in January 1984. **Ann NY Acad Sci** 442:558-563, 1985

SIGHINOLFI G, GRISENDI V, LA MARCA A. How to personalize ovarian stimulation in clinical practice. **Journal of the Turkish German Gynecological Association.**; v18, nº3, pp. 148-153, 2017.

SMITH, G. D. Utility of Animal Models for Human Embryo Culture Development
In: Rodents. Embryo Culture, 19–26, 2012

SOUZA, M. C. B. Current practice of management of infertility in low-resource settings: a Brazilian perspective. Presented to the Seminar “Assisted Reproductive Technologies (ART): Common Terminology and Management in Low-Resource Settings”. **World Health Organization. WHO/ ICMART/ LIVFF**. Geneve, 2008.

STEEVES, T. E., GARDNER, D. K. Temporal and differential effects of amino acids on bovine embryo development in culture. **Biology of reproduction**, v.61, pp. 731 – 40, 1999.

STEPTOE, P.C., EDWARDS, R. G. Birth after reimplantation of a human embryo. **The Lancet**, v. 2, n. 366, 1978.

STRATHERN, M. Reproducing the future: anthropology, kinship and reproductivem technologies Manchester: **Manchester Univresity Press**, 1993.

SUMMERS MC. A brief history of the development of the KSOM family of media. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. V. 30, n^o3, pp. 995-999, 2013.

SUN, N., et al. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from adult human adipose stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, pp.15720–15725, 2009.

SUNDE, A., et al. Time to take human embryo culture seriously. **Human Reproduction**, v.31, n^o10, pp. 2174–2182, 2016.

TESARIK, J. Paternal effects on cell division in the human preimplantation embryo. **Reproductive biomedicine online**, v.10, pp.370 – 375, 2005.

THOMSON, JA, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science**, v. 282, pp.1145-7, 1998.

THOMPSON SM, ONWUBALILI N, BROWN K, JINDAL SK, MCGOVERN PG. Blastocyst expansion score and trophectoderm morphology strongly predict successful clinical pregnancy and live birth following elective single embryo blastocyst transfer (eSET): a national study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**; v 30, pp. 1577–1581, 2013.

- UMRANIKAR, A. et al. Multiple births following *in vitro* fertilization treatment: redefining success. **European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology**, v.170, pp.299 – 304, 2013.
- UNITED KINGDOM. Department of Health & Social Security. *Report of the Committee of Inquiry into Human Fertilisation and Embryology* Chairman: Dame Mary Warnock, DBE. **Command of Her Majesty. Her majesty's stationery office**: London, July 1984 (Reprinted 1988). 103p.
- VAJTA, G. et al. Embryo culture: can we perform better than nature? **Reproductive biomedicine online**, v.20, pp.453 – 69, 2010.
- VELKER, B.A.M., DENOMME, M. M., MANN, M. R. W. Embryo culture and epigenetics. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v.912, pp.399 – 421, 2012.
- VERFAILLIE, C.M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in cell biology**, v.12, pp.502 – 508, 2002.
- WAGERS, A. J., WEISSMAN, I. L. Plasticity of Adult Stem Cells. **Cell**, v.116, n°5, pp.639 – 648, 2004.
- WHITTEN, W. K. Culture of tubal ova. **Nature** v.179, pp.1081 – 1082, 1957.
- WU M-Y, CHAO K-H, CHEN C-D, CHANG L-J, CHEN S-U, YANG Y-S. Current Status of Comprehensive Chromosome Screening for Elective Single-Embryo Transfer. **Obstetrics and Gynecology International**.; pp. 1-6, 2014.
- XIE, Y. et al. Pipetting causes shear stress and elevation of phosphorylated stress-activated protein kinase/jun kinase in preimplantation embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.74, n°10, pp.1287 – 1294, 2007.