MARIANNA FERREIRA GONÇALVES

PAPEL DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO SANGUE MENSTRUAL NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM UM MODELO DE CO-CULTIVO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM PESQUISA BIOMÉDICA (BIOFÍSICA)

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Centro de Ciências da Saúde

Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

2018

Marianna Ferreira Gonçalves

PAPEL DAS CÉLULAS MESENQUIMAIS DERIVADAS DO SANGUE MENSTRUAL NO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO EM UM MODELO DE CO-CULTIVO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Mestrado Profissional em Formação para Pesquisa Biomédica da Universidade Federal do Rio de Janeiro visando à obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Biomédica.

Orientadoras: Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Tânia Maria Ruffoni Ortiga

Coorientador: Marcel Frajblat

Rio de Janeiro

2018

Gonçalves, Marianna Ferreira

Papel das células mesenquimais derivadas do sangue menstrual no desenvolvimento embrionário em um modelo de co-cultivo. / Marianna Ferreira Gonçalves. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica, 2018.

58 f.: il.; 31 cm.

Orientadoras: Regina Coeli dos Santos Goldenberg e Tânia Maria Ruffoni Ortiga.
Coorientador: Marcel Frajblat.
Dissertação (mestrado) -- UFRJ, / CCS, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2018.

Referências: f. 41-48.

1. Células Mesenquimais Estromais. 2. Técnicas de cultura embrionária. 3. Técnicas de cocultura. 4. Desenvolvimento Embrionário- fisiologia. 5. Técnicas de Reprodução Assistida. 6.Menstruação. 7. Bioquímica - tese. I. Goldenberg, Regina Coeli dos Santos. II. Ortiga, Patrícia Fernanda. III. Frajblat, Marcel. IV. UFRJ, CCS, IBCCF, Mestrado Profissional em Formação para a Pesquisa Biomédica. V. Título.

"Papel das células mesenquimais derivadas do sangue menstrual no desenvolvimento embrionário em um modelo de co-cultivo"

MARIANNA FERREIRA GONÇALVES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA SUBMETIDA À UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM FORMAÇÃO PARA A PESQUISA BIOMÉDICA.

APROVADA POR:

Rio de Janeiro, 28 de maio de 2018.

DR. RONALDO DA SILVA MOHANA BORGES (DOUTOR – UFRJ)
(COORDENADOR DO CURSO DE MESTRADO PROFISSIONAL DE FORMAÇÃO PARA PESQUISA BIOMÉDICA)

DRA. REGINA COELI DOS SANTOS GOLDENBERG (DOUTOR – UFRJ) – ORIENTADOR

DRA. TÂNIA MARIA RUFFONI ORTIGA (DOUTOR – UFRJ) – 2º ORIENTADOR

DR. MARCEL FRAJBLAT (DOUTOR – UFRJ) – COORIENTADOR

DR. PEDRO MORENO PIMENTEL COELHO (DOUTOR – UFRJ) – REVISOR

DRA. ISALIRA PEROBA REZENDE RAMOS (DOUTOR – UFRJ)

DR. LEONARDO DE SOUZA MENDONÇA (DOUTOR – UFF)

DRA. MARIANA BOECHAT DE ABREU (DOUTOR – UFRJ)

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sandra e Wanderlei, por serem fonte constante de amor e confiança. Cada etapa concluída até aqui só foi possível por vocês acreditarem em mim e por me incentivarem a construir meus próprios sonhos. Uma vida inteira de gratidão.

À minha madrinha Olidéa e à minha avó Jorgelina (*in memoruim)*, pelo apoio incondicional em todas as etapas da minha vida. Bondade e paciência fazem parte do meu caráter porque tive vocês como referência.

Ao meu cúmplice, Philipe, pelo nosso crescimento particular e nossa habilidade de compartilhar anos como se fossem dias. Nossas diferenças nos unem e juntos, somos mais fortes.

À minha orientadora, Regina Goldenberg pelos ouvidos atentos e disponibilidade de escutar uma aluna desconhecida no corredor. Obrigada pela confiança e liberdade em relação aos estudos, mas principalmente pela sua boa-vontade e disponibilidade em me ensinar.

À minha orientadora Tânia Ortiga, pelos conselhos, incentivos e trocas. Obrigada pela disponibilidade imensa em me ajudar, por acreditar no nosso propósito e caminhar lado a lado nas dificuldades. Que nossa parceria não se limite à esse momento.

Às amigas que ganhei no decorrer destes prazerosos anos, Madellon e Lilian. Compartilhar com vocês essa fase fez dela mais prazerosa, deixando uma saudade grande dos dias intermináveis que se tornavam leves com boas risadas e brigadeiros.

Ao meu amigo Fernando, que desde o início compartilhou afinidades e objetivos, e se mostrou mais do que um colega de turma. Sua energia positiva e nossa vontade de aprender e crescer juntos trilharam caminhos profissionais do qual hoje sou imensamente grata.

Às minhas colegas de laboratório Rosana, Karina, Julia Helena, Lívia e Priscila. Sinto que ainda tinha muito a aprender e a compartilhar com vocês e

agradeço por toda paciência e boa vontade que tiveram em me ajudar em cada dúvida e dificuldade.

Aos meus queridos companheiros de trabalho, Vanessa, Caio, Fernando, Maria Cecília e Paula, pela compreensão dos momentos em que parecia impossível conciliar as duas rotinas. O incentivo diário de vocês vem em forma de sorrisos e companheirismo, e torna mais gostoso poder terminar esta etapa ao lado de vocês.

A todas as pessoas que passaram por mim nesta caminhada, proporcionando meu crescimento pessoal e aprendizado por cada experiência compartilhada.

RESUMO

GONÇALVES, MARIANNA FERREIRA. **Papel das células mesenquimais derivadas do sangue menstrual no desenvolvimento embrionário em um modelo de co-cultivo.** Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica). Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Laboratório de Endocrinologia Translacional e Laboratório de Ciência Animal. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

O cultivo embrionário *in vitro* visa promover condições otimizadas para que o desenvolvimento do embrião ocorra de maneira semelhante às condições fisiológicas no útero materno. As células mesenquimais provenientes do sangue menstrual (CeSaM) possuem características de auto-renovação e grande potencial proliferativo, podendo ser um excelente modelo celular de camada alimentadora em um sistema de co-cultivo. O objetivo do nosso estudo foi avaliar se o co-cultivo de embriões de camundongo com células estromais mesenquimais derivadas do fluido menstrual (CeSaM) poderia promover a otimização desse cultivo. Para tanto, 151 pré embriões no estágio de duas células foram randomicamente distribuídos em três condições distintas de cultivo: (1) meio de cultivo GV-BLAST suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) n = 50; (2) GV-BLAST 20% SFB e co-cultivo com CeSaM n=53; (3) GV-BLAST 20% SFB, condicionado por 72 horas em contato com as células mesenquimais n=48. Para o co-cultivo, as CeSaM, entre a 6ª e 7ª passagens, foram tripsinizadas e plaqueadas em placas de 96-poços na concentração de 1,5 x 10^4 células por poço. Após 24 horas em cultivo das células, 2-3 embriões foram colocados em cada poço, imersos em 200 µl de meio de cultivo para serem observados até o 5º dia de desenvolvimento. As análises morfológicas dos embriões e das células foram realizadas por microscopia ótica e as taxas de blastocistos gerados foram calculadas. O grupo em que os embriões foram co-cultivados com as CeSaM apresentou a maior taxa de evolução para blastocisto (69,8%), enquanto os outros grupos (1) e (3) apresentaram taxas de 30,0% e 31,25%, respectivamente. Dentre os blastocistos, foram visualizados blastocistos iniciais, expandidos, em *hatching* e com *hatching* completo. Os blastocistos vistos no grupo de co-cultivo mostraram maior índice de expansão e desenvolvimento

(56,8%), quando comparados com os outros grupos. Nosso estudo sugere que o modelo de co-cultivo dos embriões com as CeSaM pode ter um impacto benéfico no desenvolvimento dos mesmos. Essa estratégia de cultivo *in vitro* pode ser uma alterativa ou um método de enriquecimento para o microambiente no qual os embriões são cultivados nos serviços de reprodução humana assistida.

Palavras-chave: Co-cultivo, célula mesenquimal derivada do sangue menstrual, desenvolvimento embrionário.

ABSTRACT

GONÇALVES, MARIANNA FERREIRA. **The role of Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal in Embryonic Development using a co-cultivation model.** Dissertação (Mestrado Profissional em Pesquisa Biomédica). Laboratório de Cardiologia Celular Molecular, Laboratório de Endocrinologia Translacional e Laboratório de Ciência Animal, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

In vitro embryonic culture, promotes optimized conditions for the embryo development in order to get closer to uterine conditions. Mesenchymal cells of the menstrual blood (MenSCs) have self-regenerating characteristics and high proliferative potential, and could be able to be an excellent cellular model of feeding in a co-culture system. Here we evaluated whether co-culture with human menstrual blood-derived mesenchymal stem cells (MenSCs) was able to promote embryo culture optimization. We randomly allocated 151 mouse embrios in 3 different culture conditions: (1) GV-BLAST culture medium supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) n=50; (2) GV-BLAST culture medium with 20% FBS and co-culture with MenSCs n=53 and (3) culture medium GV-BLAST 20% FBS conditioned for 72 hours in contact with MenSCs n=48. MenSCs were used at the concentration of 1.5 x 10^4 cells in a 96-well plate, in the fifthy or sixthy passage, with 2-3 embryos per well immersed on 200 µl of culture medium. The embryos were collected on the second day of development, in a two-cell stage, and observed until the fifth day of development. The morphological analyzes were done by imaging in the optical microscope and the blastocyst rates were calculated. Fifty embryos were observed in group (1), 53 embryos in group (2) and 48 embryos in group (3). The group that presented the highest blastocyst rate was the co-culture group with MenSCs (69.8%), while the other groups (1) and (3) presented a rate of 30.0% and 31.25%, respectively. Among the blastocysts: initial blastocyst, expandable, hatching and full hatching were visualized. The blastocysts seen in the co-culture group showed a higher degree of expansion when compared to the other groups. Our study suggests that MenSCs provide beneficial factors for the embryo. This strategy may be an alternative or an enrichment method for the embryo culture microenvironment in assisted human reproduction services.

Keywords: cocultive, human menstrual blood-derived mesenchymal cells, embryonic development.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AVC: acidente vascular cerebral

BMP4: proteínas ósseas morfogenéticas - 4 (do inglês *bone morphogenetic proteins-4*)

CCS: Centro de Ciência e Saúde

CeSaM: células mesenquimais estromais derivadas do fluido menstrual

CFM: Conselho Federal de Medicina

CTC: Centro de Terapia Celular

CTH: Célula-tronco hematopoiética

CTEh: célula-tronco embrionária humana

D2: segundo dia de desenvolvimento embrionário

D5: quinto dia de desenvolvimento embrionário

DMEM: Meio Eagle modificado por Dulbeco – F12 (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12*)

DMSO: dimetilsulfóxido

EDTA – ácido

EDTA: ácido etileno diamono tetracético

ESCA: Esterelidade sem causa aparente

FGF-2: fator de crescimento de fibroblasto (do inglês *fibroblast growth factor-2*)

FIV: Fertilização *in vitro*

HUCFF – Hospital Universitário Clementino Fraga Filho

IBCCF: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide

IGF-1: fator de crescimento insulina 1 (do inglês *insulin growth factor-1*)

IMSI – Injeção de Espermatozoide Morfologicamente Selecionado

MEF: fibroblastos de embriões de camundongos (do inglês *mouse embryonic fibroblasts)*

mHTF - Meio de fluido tubário humano modificado com gentamicina (do inglês *Modified Human Tubal Fluid Medium – Gentamicin*)

P4: quarta passagem

P5: quinta passagem

P6: sexta passagem

P7: sétima passagem

PBS: solução salina de tampão fosfato (do inglês *phosphate buffered saline*)

PEDF: fator derivado do epitélio pigmentado (do inglês *Pigment epithelium-derived factor*)

PGD – Diagnóstico Pré-Implantacional

PGS – Mapeamento genético pré-implantacional (do inglês “screanning”)

SFB – Soro fetal bovino

TGF*β*-1*:* Fator de crescimento de transformação beta-1 (em inglês *transforming growth factor beta-1*)

UI – unidades internacionais

VEGF: fator de crescimento endotelial vascular (do inglês *vascular endotelial growth fator*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1
1.1. Infertilidade 1
1.2. Reprodução Assistida 1
1.3. Cultivo Embrionário 3
1.4. Meios de Cultivo 4
1.5. Sistema de co-cultivo 6
1.5.1. Sistema de co-cultivo como aprimoramento do cultivo embrionário 7
1.6. Células-tronco 8
1.6.1. Células-tronco embrionárias e adultas 9
1.6.2. Células-tronco hematopoiéticas 10
1.6.3. Células mesenquimais estromais 11
1.6.3.1. Células mesenquimais estromais derivadas do sangue menstrual 11
2. JUSTIFICATIVA 12
3. OBJETIVO 13
3.1. Objetivos Específicos 13
4. METODOLOGIA 14
4.1. Animais 14
4.1.1. Obtenção dos embriões de camundongo no estágio de duas células 15
4.2. Células 15
4.2.1. Coleta do fluido menstrual como fonte de células mesenquimais 15
4.2.2. Obtenção das células mesenquimais derivadas do fluido menstrual ..16
4.2.3. Isolamento das CeSaM presentes no sangue menstrual 16
4.2.4. Cultivo e expansão da fração mesenquimal das células 18
4.2.5. Utilização da CeSaM como camada de co-cultivo 18
4.2.6. Utilização da CeSaM como meio de cultivo condicionado de 72 horas 19
4.3. Embriões 19
4.3.1. Superovulação das fêmeas de camundongo 19
4.3.2. Lavagem das tubas uterinas para obtenção dos embriões no estágio de duas células 20

4.3.3. Registro da evolução dos embriões do segundo ao quinto dia de desenvolvimento 22
4.3.4. Classificação dos embriões 23
4.3.5. Classificação dos blastocistos 23
4.4. Análise Estatística 24
5. RESULTADOS 24
5.1. Monocamada de CeSaM para co-cultivo 24
5.2. Quantificação de blastocistos nos três ambientes de cultivo 26
5.3. Quantificação dos blastocistos em diferentes estágios de expansão 28
5.4. Quantificação dos blastocistos de acordo com o grau de expansão e microambiente de cultivo 30
5.5. Levantamento de custos do protocolo de co-cultivo 32
6. DISCUSSÃO 35
7. CONCLUSÃO 39
8. Referências Bibilográficas 40
9. ANEXO A – Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa 49
10. ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 54
11. ANEXO C – Aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais em experimentação científica 57

1. INTRODUÇÃO

1.1. Infertilidade

A infertilidade conjugal é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma doença, caracterizada pela incapacidade de um casal gerar uma gravidez depois de doze meses de relações sexuais frequentes sem quaisquer uso de métodos contraceptivos (WHO, 2018). Tratando-se ainda da capacidade de gerar a gravidez, o conceito de fecundabilidade, ou seja, a probabilidade da concepção natural acontecer, apresenta-se com taxa de 20-25% para casais sem nenhuma patologia reprodutiva, na faixa etária de 33-35 anos de idade feminina (Raimundo, 2015). Diversos quadros clínicos são responsáveis pela diminuição da fecundabilidade de um casal, ou até mesmo o diagnóstico de infertilidade. Atribui-se um terço da incidência da infertilidade a causas de origem feminina, um terço a causas de origem masculina e o último terço a ambos os parceiros (Zegers-Hochschild *et al*, 2009). Dentre as diversas causas da incidência da patologia, estima-se que 26% dos casos são atribuídos à disfunção de túbulos seminíferos, hipogonadismos (masculinos) e defeitos testiculares; 21% a disfunções ovulatórias, 14% são referentes à disfunções tubárias; 6% referentes à endometriose, 5% atribuídos a outras causas e 17% estão relacionados aos diagnósticos inespecíficos ou esterilidade sem causa aparente (Raimundo, 2015).

A esterilidade sem causa aparente (ESCA) refere-se ao casal que realizou a investigação primordial, com laudos de espermograma, testes de ovulação e potencialidade tubária, onde apresentou-se diagnósticos normais e que ainda assim não obtém resultados positivos nas tentativas de concepção (Ray, 2012).

1.2. Reprodução Assistida

Desde 1978, a medicina oferece uma solução confiável para a infertilidade conjugal, quando foi concebida através de uma técnica de reprodução assistida em laboratório a primeira criança humana, chamada Louise Brown. (Kamel, 2013). A manipulação dos gametas femininos e masculinos, feita *in vitro* por profissionais qualificados permite gerar um pré-embrião, que pode ter seu desenvolvimento

monitorado e apresentar potenciabilidade de gerar um feto, quando transferido ao ambiente uterino (Leese *et al*, 1993).

As etapas de um tratamento de reprodução assistida são individualmente importantes e fazem parte de um amplo conjunto de procedimentos clínicos e laboratoriais. Como demonstrado na figura 1, o tratamento têm início com uma estimulação ovariana através de hormônios com finalidade de recrutamento folicular. Posteriormente, a mulher é submetida à punção folicular, para a captação dos óvulos (Satvinder *et al*, 2018). O material masculino é na maioria das vezes coletado através de masturbação, porém pode ser extraído através de aspirações subcutâneas ou biópsias testiculares dependendo da anamnese masculina (Pasqualotto *et al*, 2003). Nos casos de tratamentos de baixa complexidade, é feita apenas a otimização dos gametas masculinos (Ombelet, Robays, 2015), enquanto nos casos de tratamentos de maior complexidade, uma vez que ambos os gametas estejam prontos para manipulação, é escolhida uma técnica de fertilização visando a obtenção de embriões (Satvinder *et al*, 2018).

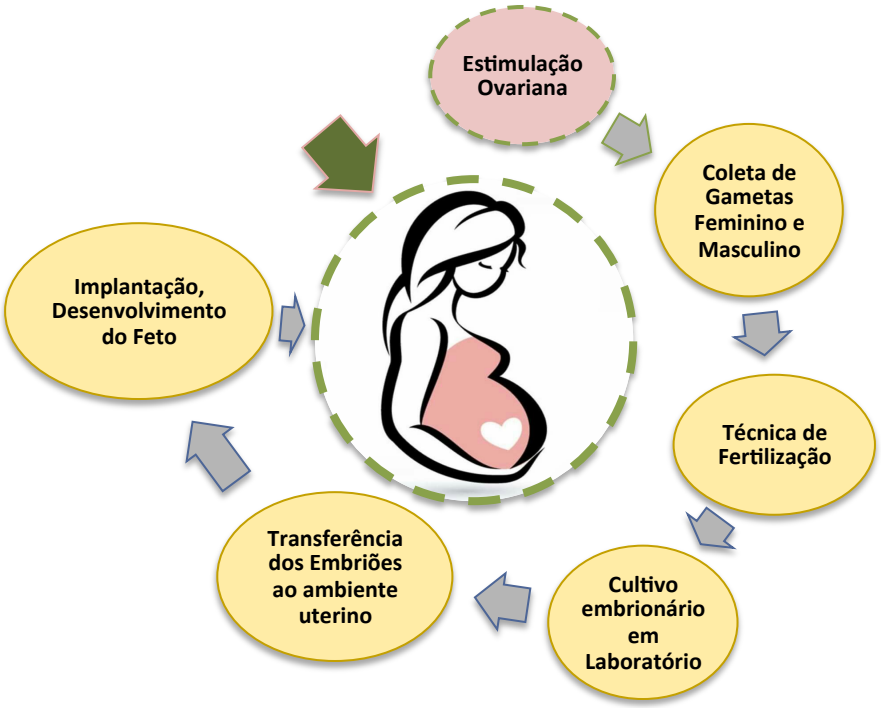

Figura 1: Etapas do tratamento de Reprodução Assistida, esquematizadas cronologicamente. O objetivo do sucesso individual de cada etapa é a gravidez no fim do tratamento. Dentro dos círculos estão descritas as etapas pertencentes ao tratamento de maneira subsequente. Fonte da

figura demonstrativa de gravidez: http://www.wellnessdenver.com/naturopathy/someone-know-trying-conceive-experiencing-fertility-issues/

Os embriões gerados e manipulados em laboratórios são mantidos em microambiente controlado que proporcionam condições otimizadas para sustentar o seu desenvolvimento até o estágio de mórula (terceiro dia) ou blastocisto (quinto dia). A etapa concluinte do tratamento, geralmente, consiste na transferência dos embriões que estão em cultivo laboratorial para o ambiente uterino, disponibilizando a eles fatores adequados para implantação e desenvolvimento (Saharkhiz *et al*, 2014).

A evolução tecnológica contribuiu para o aprimoramento de técnicas laboratoriais específicas na área de reprodução assistida, aplicando conceitos como Fertilização *in vitro* clássica (FIV) (Jin *et al,* 2015), Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide (ICSI), Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide Morfologicamente Selecionado (IMSI) (La Sala *et al*, 2015), Diagnóstico Pré-Implantacional (PGD) e Mapeamento Genético Pré-Implantacional (PGS) (Hu *et al*, 2015).

1.3. Cultivo embrionário

O cultivo embrionário *in vitro* tem o objetivo de permitir que o embrião consiga se desenvolver fora das condições uterinas de maneira adequada. As análises feitas durante este cultivo determinam qual embrião possui o melhor desenvolvimento, baseando-se majoritariamente em parâmetros morfológicos (Kovacs, 2014) e visam a obtenção de embriões viáveis e com potencial de implantação ao final de cinco ou seis dias de cultivo.

As etapas de cultivo *in* vitro dos embriões vem sendo cada vez mais estudadas e aprimoradas por pesquisadores (Peña et al, 2017) e esta etapa do tratamento está diretamente relacionada aos nutrientes que são disponibilizados ao embrião e às condições em que os mesmos são mantidos.

Os nutrientes necessários para o desenvolvimento dos embriões estão condicionados nos meios de cultura, utilizados para manter o metabolismo embrionário ativo. Inicialmente, a composição dos meios apresentava concentração restrita de glicose, piruvato e lactato. (Gardner, 1996 ; Martin, 2000). Com a

descoberta de diferentes concentrações desses compostos nas distintas partes do aparelho reprodutor feminino, foi possível observar mudanças dinâmicas no metabolismo embrionário e que assim, as necessidades diferem de acordo com o estágio de desenvolvimento (Gardner, 1993).

Logo após a fecundação do óvulo, o piruvato é a única fonte de energia utilizada pelo embrião, sendo responsável pela realização da primeira divisão mitótica (VAJTA *et al*, 2010). Nas mitoses subsequentes, onde o embrião já se encontra no estágio de duas células, a necessidade da utilização do lactato passa a ser considerada e a partir deste estágio o embrião começa a estabelecer vias metabólicas mais eficazes para a utilização da glicose. Conforme se aproxima do estágio de blastocisto, e da formação da massa celular interna, a necessidade de vias metabólicas capazes de realizar glicólise se torna ainda mais importante, uma vez que a massa celular interna é exclusivamente dependente desse tipo de metabólito (Gardner e Lane, 2008).

A manipulação específica dos micronutrientes e moléculas adicionais é um dos benefícios de se manter o embrião fora do trato fisiológico. Além das principais fontes de energia das quais o metabolismo embrionário é dependente, existem moléculas que otimizam a utilização desses meios. Estratégias bem-sucedidas como a adição de aminoácidos, tem importante funcionalidade como regulador de osmolaridade e agente de manutenção do pH intracelular (Lane e Gardner, 2006). Devem ser citados ainda, a adição de ácido ascórbico e ácido fólico que funcionam como fonte de vitaminas, o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) atuando na redução do estresse oxidativo e a suplementação com albumina, que é a principal fonte proteica, variando entre 10-20% nos meios comercializados, e são de suma importância para eliminação de efeitos tóxicos e impedimento de aderência dos embriões nas placas em que estão sendo mantidos (Vajta *et al*, 2010).

1.4. Meios de cultivo

A diversidade de meios de cultura disponíveis atualmente é vasta, e a escolha adequada depende do tipo de cultivo aplicado a cada laboratório. Os tipos de cultivo podem ser classificados como curtos ou prolongados (Aoki, 2005) e para cada tipo, há um meio de cultivo recomendado (figura 2). Em cultivos curtos são usados meios simples, que caracterizam-se por sustentar o desenvolvimento do

embrião do estágio de zigoto até o terceiro dia (D3), onde é considerado mórula; enquanto em cultivos prolongados são usados meios sequenciais ou complexos (Garder, 2003; Cossiello *et al*, 2012)

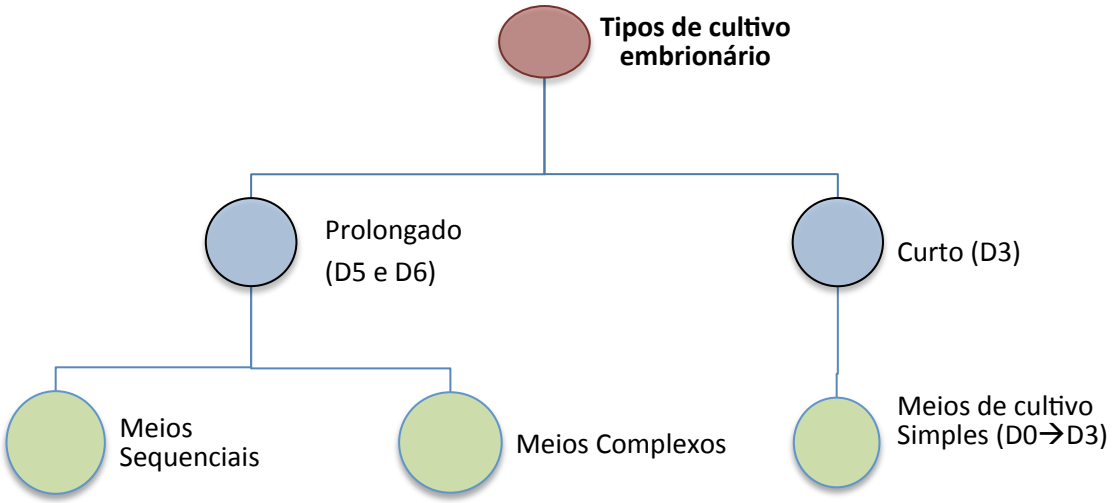

Figura 2: Diversidade de meios de cultivo disponíveis para serem utilizados mediante a escolha de cultivo curto ou prolongado.

Os cultivos prolongados proporcionam aos serviços de reprodução assistida maior controle sobre os casos, além de viabilizar outros tipos de análise do embrião fora a morfológica. Sendo assim, atualmente o cultivo prolongado é o mais utilizado e os meios sequenciais ou complexos possuem maior espaço no mercado. Meios sequenciais consistem geralmente em dois produtos distintos, com diferentes composições. Esses meios caracterizam-se por disponibilizar nutrientes específicos para cada fase de desenvolvimento. Para tanto, é realizada troca do meio quando o embrião se encontra no terceiro dia de desenvolvimento, com o intuito proteger o embrião do acúmulo de amônia e outros metabólitos, que podem ser altamente prejudiciais ao seu desenvolvimento (Lane, Gardner, 2006).

Os meios complexos, por sua vez, caracterizam-se por não precisarem da renovação de nutrientes durante o cultivo. Disponibilizam todos os metabólitos que o embrião necessita em ampla concentração e a utilização deste permite que o embrião selecione quais compostos serão utilizados conforme o requerimento do seu metabolismo. A grande vantagem da utilização deste tipo de meio é a possibilidade do desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (quinto

dia) sem nenhum tipo de intervenção externa, variação de temperatura e pH (Cossiello *et al*, 2012).

Atualmente, a utilização de meios de cultivo complexos já é utilizada em grande escala nos serviços de reprodução assistida no âmbito nacional e internacional, uma vez que estudos comparativos apontam que o desenvolvimento embrionário com meios contínuos ocorrem de maneira similar ou superior e proporcionam menor exposição do embrião fora das condições otimizadas de cultivo (Sotiroska *et al*, 2015).

Os meios de cultivo adquiridos comercialmente garantem segurança e controle de qualidade, e atualmente os principais fornecedores destes materiais são representados no Brasil pelos laboratórios VitroLife, Medicult, Irvine e LifeGlobal (Mauri *et al*, 2001). O meio de cultivo contínuo GV-BLAST™ (Ingamed, Brazil) é um produto nacional, que apresenta grande eficácia em termos de fertilização, clivagem, desenvolvimento até o estágio de blastocisto e taxas de gravidez (Ceschin *et al*, 2016) e pelo motivo de disponibilidade e custo, foi escolhido para ser aplicado no presente estudo.

A busca de resultados positivos passa pelo aprimoramento e otimização de cada etapa deste procedimento. Dentre a literatura científica disponível, podemos citar estudos de comparação de meio de cultivo (Wundera *et* al, 2014), comparação dentre os cultivos curtos ou prolongados (Sotiroska *et al*, 2015), utilização de equipamentos de monitorização em tempo real (Sciorio, Thong, Pickering, 2017) e opções de co-cultivo celular (Almodin et al, 2001).

1.5. Sistemas de co-cultivo

O co-cultivo celular é uma estratégia de cultivo que proporciona a manutenção *in vitro* de viabilidade de duas células, realizado concomitamente e no mesmo microambiente (Birkenfeld, Navot, 1991).

Sugere-se que o sistema de co-cultivo promova benefícios aos tipos celulares envolvidos, através de condicionamentos positivos e negativos. Condicionamento positivo é a habilidade das células “alimentadoras” de modificar o meio de cultivo através da secreção de fatores, enquanto o condicionamento negativo (ou

detoxificação) é a capacidade das mesmas células “alimentadoras” de realizar a remoção de compostos nocivos do meio de cultivo (Farouk, Vlad, 2008).

O conceito de co-cultivo, quando aplicado ao universo da reprodução assistida apresenta diversas abordagens, e o principal ponto convergente entre eles é a proposta que o contato embrião-célula venha a ser necessário para conexões celulares entre a a zona pelúcida e as “células alimentadoras”, com a finalidade de que possa ser realizada a troca cruzada de glicoproteínas e outros metabólitos (Bongso *et al*, 1991).

1.5.1. Sistema de co-cultivo como aprimoramento do cultivo embrionário

Há anos atrás, o co-cultivo foi abordado na reprodução assistida com a utilização de distintos tipos celulares que poderiam ser capazes de promover um microambiente propício ao desenvolvimento embrionário. Os estudos de meados dos anos 90, utilizaram diversos tipos celulares para essa otimização, como células humanas das tubas uterinas (Bongso *et al*, 1989), fibroblastos de origem bovina, mais especificamente do útero das vacas (Wiemer *et al*, 1989), fibroblastos embrionários de ratos (Seyed *et al*, 2009), células autólogas dos cumulus (Farouk, Vlad, 2009) e células Vero (CDR, Rebecca, 2000).

As células Vero são definidas como uma linhagem celular derivada do rim do macaco africano verde (Cercopithecus) que foi estabelecida por Y. Yasumura e Y. Kawakita em 27 de Março de 1962, na Universidade de Chiba, no Japão. Essa linhagem celular foi utilizada de maneira vasta para estudos de replicação virais e foram testadas em estudos clínicos (Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee, 2000).

Os estudos com células autolólogas do cumulus representam grande valor científico, uma vez que sugere benefícios correlacionados com efeitos parácrinos, através da secreção de proteínas e esteróides. O efeito parácrino está diretamente ligado ao co-cultivo devido à interação entre as “células alimentadoras” e os embriões não ser possível por junções comunicantes neste estágio de desenvolvimento dos embriões (Farouk, Vlad, 2009).

A maioria dos estudos de co-cultivo (Almodin *et al*, 1999; Bavister *et al*, 1995; Almodin *et al*, 2001; Farouk, Vlad, 2009) foram realizados em uma época em que os meios complexos ainda não estavam bem implementados na rotina dos laboratórios.

Atualmente, com a rotina de cultivo prolongado bem definida, os estudos de co-cultivo podem ter uma nova abordagem, quando correlacionados com meios de cultivo complexo, onde não é necessária a renovação de nutrientes e a interferência para ambos os tipos celulares em cultivo é menor.

Apesar de diversas estratégias de terapia celular terem sido estudadas, as atualizações e novas possibilidades de tipos celulares que podem ser utilizados como camada alimentadora de co-cultivo continuam em progresso. Tratando-se de cultivo primário para tipos indiferenciados de células temos a opção das células-tronco embrionárias, células-tronco adultas e células-tronco mesenquimais (Silva dos Santos, 2012).

1.6. Células-tronco

As células-tronco são células capazes de se manter no estágio celular indiferenciado, dividindo-se em células idênticas as originais ou podendo se diferenciar em outros tipos celulares. Existem caracterizações de acordo com a capacidade de diferenciação dessas células. Este conceito, também é denominado como plasticidade, e assim, elas podem ser classificadas como totipotentes, pluripotentes ou multipotentes (Thomson et al, 1998).

A totipotência é uma exclusivadade do zigoto e dos blastômeros gerados nas primeiras divisões mitóticas. São os únicos tipos celulares que tem potencial de se desenvolver em qualquer tecido que compõe o embrião e gerar um indivíduo adulto a partir disso (Torres-Padilla, 2008).

A pluripotência pode ser encontrada nas células de dentro do embrião. Mais especificamente na massa celular interna dos blastocistos, que são capazes de se diferenciar nos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma), além de apresentarem capacidade de proliferação no estado indiferenciado *in vitro* e de auto-renovação (ROUFOSSEAND, COOK, 2008; COWAN et al.,2004).

A multipotência é encontrada em células e tecidos adultos, possuindo menor capacidade de diferenciação quando comparadas com as outras possibilidades de plasticidade. As células multipotentes são capazes de se diferenciar apenas em células relacionadas ao seu própio tecido de origem. Geralmente, estão associadas às funções de reparação tecidual, homeostase e regeneração (JOHNSON *et al*., 2004)

1.6.1. Células-tronco embrionárias e adultas

No Brasil, a Resolução do Conselho Federal de Medicina (CFM) nº 2.168/2017 ressalta a aplicação da Lei de Biossegurança nº 11.105/2005, que prevê em seu art. 5º, a autorização para o uso dos embriões excedentes das técnicas de fertilização *in vitro* para extração de células-tronco, uma vez que esses embriões se enquadrem nos critérios de: serem classificados como inviáveis, estarem congelados há pelo menos três anos desde a data estabelecida pelo documento, e os pacientes doadores consentirem em documento livre e esclarecido com a doação para fins de pesquisa. (FRAGA et al, 2011). Apesar de representar uma dificuldade ética, essa autorização do uso de células-tronco embrionárias humanas alavancou o progresso científico no país.

Já as células-tronco adultas podem ser encontradas em diversos órgãos de um indivíduo adulto como por exemplo na medula óssea, sangue periférico, no cordão umbilical, na placenta, tecido adiposo entre outros (figura 3). Estas apresentam característica de ser multipotente e em condições fisiológicas se mantêm em um estágio celular de dormência ou em lenta proliferação. No entanto, frente a lesões podem proliferar e originar células diferenciadas para o reparo tecidual (Du, Yuan et al, 2018).

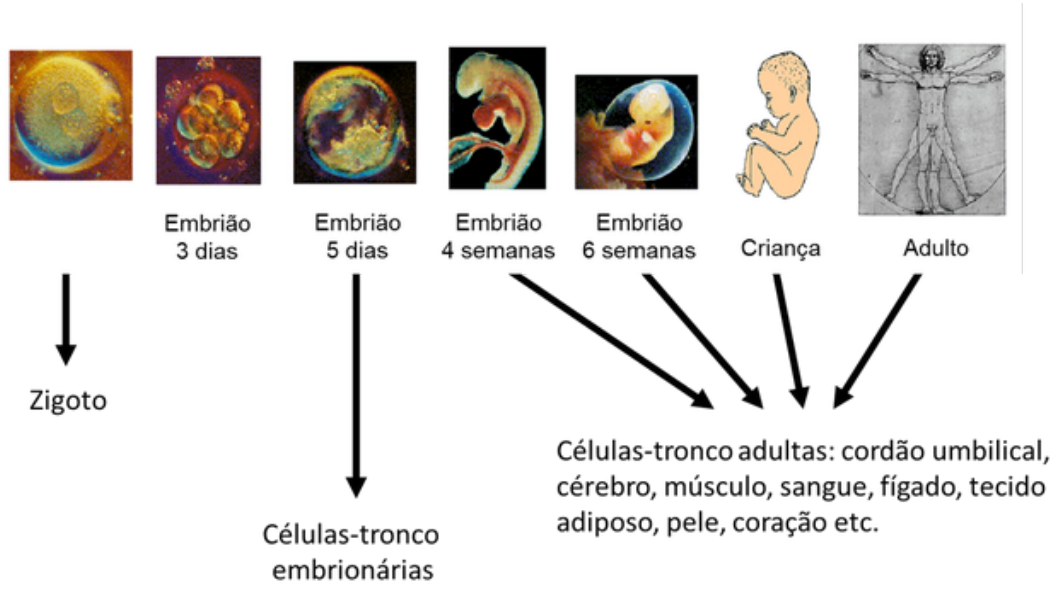

Figura 3: Origem das células-tronco embrionárias e adultas desde o desenvolvimento embrionário até o organismo em sua fase adulta. Fonte: Rede Nacional de Terapia Celular, disponível em http://www.rntc.org.br/ceacutelulas-tronco.html.

1.6.2. Células-tronco hematopoiéticas

As células-tronco hematopoiéticas (CTH) são caracterizadas pela principal função de manter a produção e autorenovação de células especializadas do tecido sanguíneo e do sistema imune, proporcionando a renovação contínua de tipos celulares essências para a fisiologia humana, como as hemácias e os linfócitos. São obtidas por métodos invasivos, como punção da medula óssea e coleta de sangue periférico e também podem ser encontradas no sangue presente no cordão umbilical, que vem a ser uma fonte alternativa dessas células (Centro de Criogenia Brasil, 2018).

Geralmente utilizadas para fins terapêuticos ou para criogenia para posterior utilização, esse tipo celular é considerado como as células-tronco adultas que foram mais bem caracterizadas até hoje. É significativo o índice de congelamento de sangue proveniente do cordão umbilical visando alternativas terapêuticas para doenças hematológicas e imunológicas e também os grupos que realizam estudos experimentais com as CTH para o tratamento de doenças como anemia falciforme, diversos tipos de leucemia, mieloma múltiplo, entre outros (DA SILVA JUNIOR, et al, 2009).

1.6.3. Células mesenquimais estromais

Considerando-se a existência de células-tronco de origem não-hematopoiética, a confirmação da presença de células-tronco no estroma da medula óssea foi considerada um marco na terapia celular, descrita por Friedenstein e colaboradores em 1976. As células mesenquimais estromais apresentam morfologia fibroblastóide e a característica bem relevante da capacidade de aderência aos frascos de cultivo celular (FRIEDENSTEIN ET AL, 1976).

Em 2006, Dominici e colaboradores publicaram um artigo propondo três critérios mínimos necessários para a classificação das células como células mesenquimais: (i) capacidade de aderência aos frascos de cultivo em condições propícias a tal; (ii) expressão de antígenos específicos somados à ausência da expressão de outros antígenos, mensurados por citometria de fluxo e (iii) capacidade de diferenciação *in vitro* em osteoblastos, adipócitos e condroblastos.

1.6.3.1 Células mesenquimais estromais derivadas do sangue menstrual

Em 2004, Chan et al., relatou a primeira evidência da existência de células mesenquimais originadas de estroma e epitélio no endométrio humano, relatando também o primeiro isolamento deste tipo celular proveniente diretamente do endométrio.

Em 2007, Meng e colaboradores conseguiram isolar células mesenquimais provenientes do sangue menstrual, com características de auto-renovação, grande potencial proliferativo e habilidade de diferenciação multipotente *in vitro*.

Dentre as diferenciações consideradas bem-sucedidas deste tipo celular podemos citar os cardiomiócitos com batimentos espontâneos após indução de infarto de miocárdio (Hida *et al.*, 2008; Ikegami *et al.*, 2010; Mou *et al.*, 2013), modelos de tratamento experimental para doenças como isquemias (Murphy *et al.*, 2008), acidente vascular cerebral (AVC) (Borlongan *et al.*, 2010), diabetes mellitus tipo I (Li H.Y. *et al.*, 2010; Santamaria *et al.*, 2011), doença de Parkinson e outras doenças neurodegenerativas (Sanberg *et al.*, 2011).

Diante desses avanços científicos, é visto que o sangue menstrual tem potencialidade de ser uma excelente fonte de células mesenquimais e apresenta consideráveis vantagens, tais como: (i) ser obtido por um método não invasivo, (ii) possibilidade de cultura in vitro, com baixo custo, (iii) facilidades éticas e grande disponibilidade de amostras (X. Du, et al., 2015).

No Brasil, em 2008, nosso grupo isolou e caracterizou o uso das células mesenquimais estromais derivadas do sangue menstrual (CeSAM). Esta caracterização permitiu o desenvolvimento de projetos que exploraram a utilização da CeSAM em diversos âmbitos e finalidades *(*Asensi *et al*, 2008, 2009, 2012).

Silva dos Santos e colaboradores (2012), demonstraram que a CeSAM libera diversos fatores de crescimento como o fator de crescimento de fibroblasto (FGF-2, do inglês *fibroblast growth factor-2*), proteínas ósseas morfogenéticas - 4 (BMP4, do inglês *bone morphogenetic proteins-4*), fator de crescimento de transformação beta-1 (TGF-β1, em inglês *transforming growth factor beta-1*), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês *vascular endotelial growth fator*) e o fator derivado do epitélio pigmentado (PEDF, do inglês *Pigment epithelium-derived factor*) além de ser capaz de manter o estágio indiferenciado de céulas-tronco embrionárias humanas (CTEh). Tal característica, de manter as CTEh indiferenciadas, assemelha-se às propriedades da camada alimentadora de fibroblastos (MEF), utilizada amplamente como “camada alimentadora” em modelos de co-cultivo celular. Sendo assim, as CeSaM poderiam ser uma estratégia em potencial para o co-cultivo com embriões, visando a otimização do microambiente de cultivo.

2. JUSTIFICATIVA

As pacientes submetidas ao tratamento de reprodução assistida podem se deparar com desfechos negativos ou inconclusivos sobre seus respectivos casos, onde o fator determinante para tal condição não é identificado.

Os resultados negativos ao final de um tratamento podem estar relacionados ao não-sucesso de etapas individuais ou com um conjunto de fatores somados. Existe uma demanda de resoluções inovadoras e personalização dos tratamentos, afim de atender um seleto grupo de pacientes que apresentam situações recorrentes de insucesso. O protocolo sugerido neste trabalho visa oferecer

alternativas quando há ocorrências de aborto recorrente, falha de implantação, baixa taxa de blastocistos obtidos após o cultivo embrionário e também atender aos casais com diagnóstico de esterilidade sem causa aparente.

O co-cultivo autólogo de células mesenquimais derivadas do sangue menstrual com os embriões poderia otimizar o microambiente no qual os embriões estão inseridos na etapa de cultivo oferecendo uma resolução personalizada e inovadora. Esse protocolo ofereceria um processo complementar ao tratamento e de baixo custo adicional ao orçamento previamente estabelecido.

3. OBJETIVO

Avaliar e comparar o desenvolvimento dos embriões de camundongo no intervalo do segundo ao quinto dia de evolução em três distintos grupos: presença de células mesenquimais derivadas de sangue menstrual (CeSaM), ausência da CeSaM, e meio condicionado pelo contato com as CeSaM.

3.1. Objetivos Específicos

I. Atingido o estágio de blastocisto, comparar as evoluções embriológicas dos três grupos, no âmbito de:
   - Morfologia;
   - Taxa de formação blastocistos;
   - Grau de expansão dos blastocistos.

II. Realizar o levantamento de custo do protocolo de co-cultivo sugerido neste estudo em relação ao orçamento de tratamentos oferecidos nos centros de reprodução assistida.

4. METODOLOGIA

4.1. Animais

Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética de Uso de Animais em Pesquisa do Centro de Ciências e Saúde (CCS) – Protocolo nº 108/16.

Os animais utilizados foram camundongos de ambos os sexos, da linhagem *Balb/c* em idade reprodutiva de 4-5 semanas, com peso aproximado de 20 g, obtidos no Biotério Central do Centro de Ciências e Saúde. Os animais foram mantidos no biotério de origem, com temperatura controlada de 22-23ºC, acesso livre à ração *ad libitum* e água e exposição circadiana de ciclo claro-escuro de 12 em 12 horas.

4.1.1. *Protocolo de obtenção dos embriões de camundongo no estágio de 2 células*

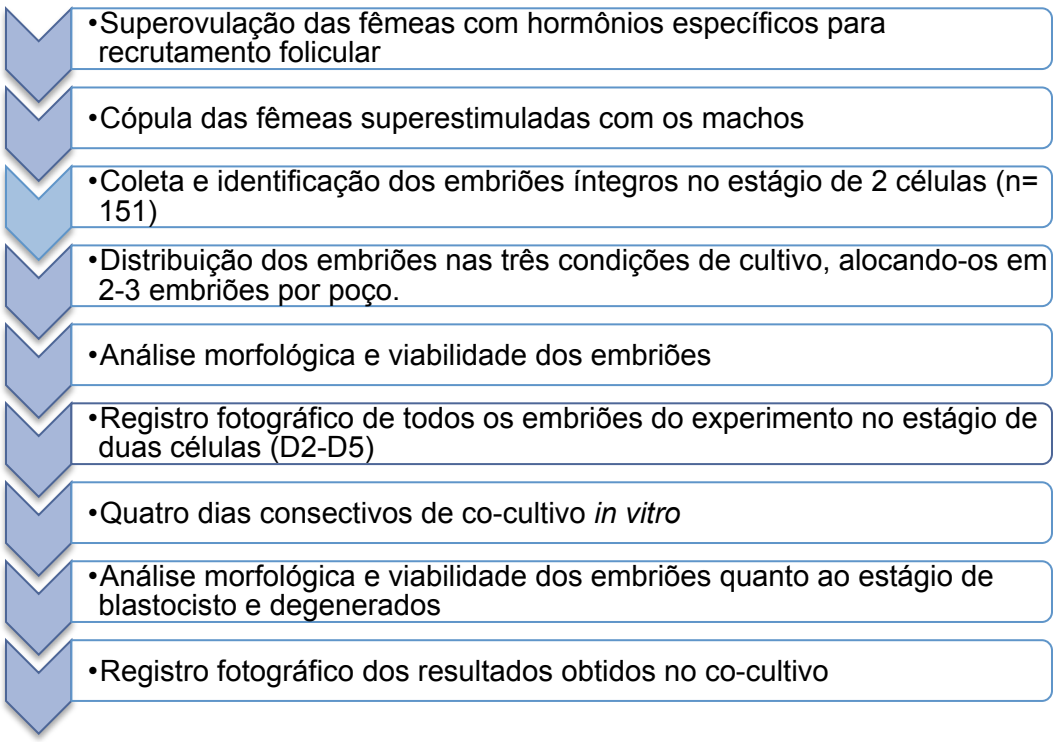

Figura 4: Fluxograma da utilização de embriões murinos. Fluxograma do uso das embriões como instrumento do experimento de co-cultivo e posterior avaliação dos blastocistos obtidos.

4.2. Células

4.2.1. *Coleta do fluido menstrual como fonte de células mesenquimais*

O protocolo adotado para o presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF) – Protocolo nº056/09.

O sangue menstrual foi coletado de mulheres jovens voluntárias saudáveis (n=4), com idade entre 18 - 30 anos, aproximadamente vinte quatro horas após o início do fluxo menstrual. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, as voluntárias receberam instruções quanto ao procedimento de coleta e à utilização do pote coletor. A coleta foi realizada em um coletor de urina contendo 5 mL de uma solução salina sem cálcio e magnésio, suplementada com penicilina 100 IU/mL, estreptomicina 100mg/mL e EDTA (0,5 mMol) para evitar contaminação e formação de coágulos.

4.2.2. *Obtenção das células mesenquimais derivadas do fluido menstrual*

O protocolo de obtenção do fluido menstrual foi padronizado para todas as células recebidas de voluntárias, afim de obter regularidade e viabilidade das células mesenquimais, conforme representado na figura 5.

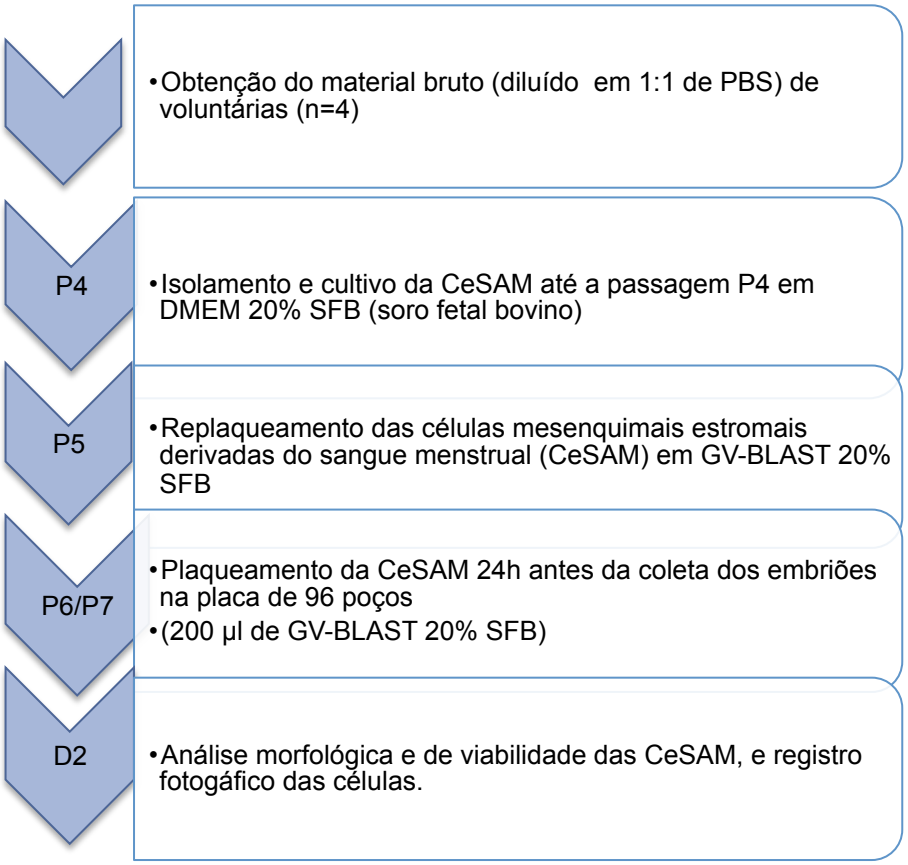

Figura 5: Fluxograma do uso das células mesenquimais como instrumento do experimento de co-cultivo. PBS: solução salina de tampão, do inglês *phospate buffered saline*; DMEM: meio Eagle modificado por Dulbeco – F12; SFB: soro fetal bovino; CeSaM: células mesenquimais estromais derivadas do fluido menstrual.

4.2.3. *Isolamento das células mononucleares presentes no sangue menstrual*

O material colhido foi diluído em solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês *Phosphate buffered saline*), na proporção 1:1, homogeneizado e centrifugado 1500 rpm por 5 minutos, conforme descrito na Figura 5. O

sobrenadante foi descartado com o auxílio de pipeta Transfer e o sedimento de células ressuspendido em 4 ml de PBS e centrifugado 1500 rpm por 5 minutos. Essa etapa foi repetida três vezes consecutivas para lavagem do material. O sedimento de células resultante das lavagens foi ressuspendido em 2,5 ml de Meio Eagle modificado por Dulbeco – F12 (DMEM-F12, do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12*) suplementado com 20% de SFB (Soro Fetal Bovino) e antibióticos (penicilina 100 IU/mL e estreptomicina 100 mg/mL) e plaqueadas em placas de cultura 35 mm² (Figura 6).

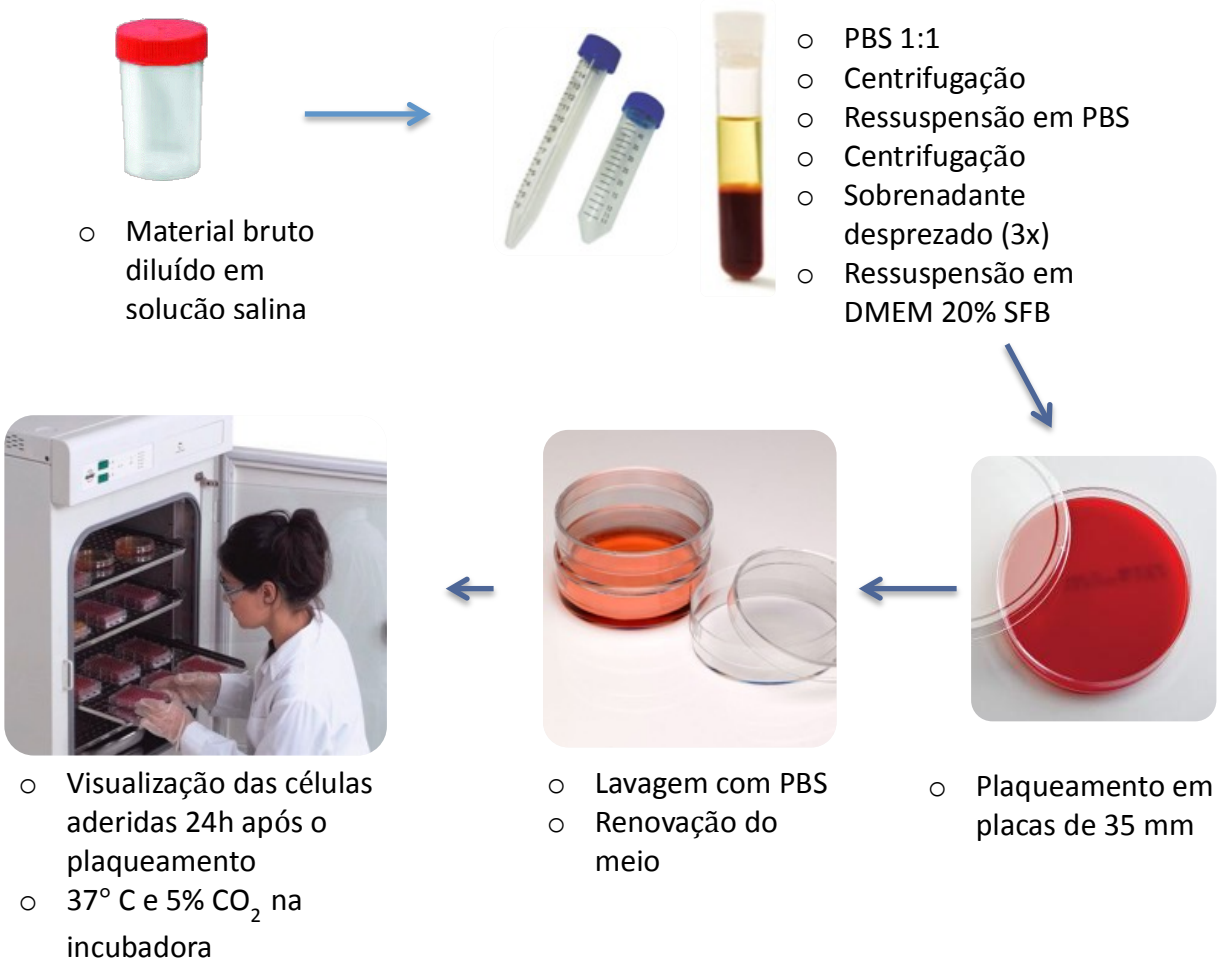

Figura 6: Ilustração demonstrativa de etapas para cultivo das células mesenquimais. Esquema ilustrativo das fases de coleta, cultivo e expansão das células. Fonte das fotografias: http://gestiondepedidos.glasschemicals.com/, www.ingamed.com.br e http://www.medicalexpo.es/. PBS: solução salina de tampão, do inglês *phospate buffered*, DMEM: meio Eagle modificado por Dulbeco – F12; SFB: soro fetal bovino

4.2.4. *Cultivo e expansão da fração mesenquimal das células derivadas do sangue menstrual*

Após o plaqueamento, as células foram mantidas em incubadora à 37ºC, com atmosfera úmida, na presença de 5% de CO_2. A primeira troca do meio de cultura ocorreu dois dias após o plaqueamento. As células e debris celulares que ainda estivessem no sobrenadante foram assim descartados. Renovou-se regularmente os nutrientes oferecidos às células de acordo com o consumo das mesmas através da troca de meio, geralmente realizada duas vezes na semana. Uma vez atingida a confluência de 70-80%, as células passaram por um processo de tripsinização com a solução 0,25% e EDTA 1 mM e foram plaqueadas em novas placas de cultura com diâmetro de 100 mm, possibilitando assim a devida expansão das mesmas, o que é denominado como “passagem” ou “passagem enzimática”. Observou-se diariamente a evolução da morfologia celular.

4.2.5. *Utilização das células mesenquimais como camada de co-cultivo*

As células foram mantidas até a quarta passagem (P4) em cultivo no meio DMEM. Porém, para o co-cultivo dessas células com os embriões de camundongo, as mesmas precisam dispor do contato com o meio GV-BLAST, pois os embriões necessitam de nutrientes adicionais que não estão disponíveis no primeiro meio mencionado. Sendo assim, foi realizado a tripsinazação e a partir da quinta passagem (P5), as células foram plaqueadas em meio GV-BLAST (Ingámed®) suplementado com 20% de SFB. As culturas foram acompanhadas diariamente observando-se a morfologia até o momento em que foram utilizadas para o co-cultivo com embriões.

As células utilizadas para o co-cultivo encontravam-se na quinta (P5) ou sexta passagem (P6), com confluência de 70-80%. Um dia antes da coleta dos embriões, as células passaram por novo processo de tripsinização, foram contadas na câmara de Neubauer (Hausser Scientific) e uma vez que sua viabilidade havia sido analisada com azul de Trypan, as mesmas foram ressuspendidas e plaqueadas nos poços da placa de poliestireno de 96 poços (Corning®) na concentração de 1,5 x 10^4 células, imersas em 200 µl de GV-BLAST 20% SFB. Em cada poço de co-cultivo com CeSAM foram colocados 2-3 embriões de camundongo no estágio de 2 células.

4.2.6. *Utilização das células mesenquimais como meio de cultivo condicionado de 72 horas*

As células utilizadas para estabelecer o meio condicionado de 72 horas passaram pela mesma metodologia de cultivo das células que foram destinadas ao co-cultivo: a partir da quinta passagem (P5), as mesmas já se encontravam em cultivo em GV-BLAST 20% SFB.

Em todos os experimentos, a placa destinada ao procedimento foi configurada 24 horas antes da coleta dos embriões. Sendo assim, as células destinadas a estabelecer o meio condicionado de 72 horas tiveram seus nutrientes renovados por troca do meio de cultivo quatro dias antes da data de coleta dos embriões de camundongo no estágio de 2 (duas) células. O meio GV-BLAST 20% SFB que estava em contato com as CeSAM foi retirado um dia antes da coleta dos embriões e colocado nos poços da placa de poliestireno de 96 poços (Corning®) em um volume de 200 µl por poço. Em cada poço de meio GV-BLAST condicionado de 72 horas foram colocados 2-3 embriões de camundongo no estágio de 2 (duas) células.

4.3. Embriões

4.3.1. Superovulação das fêmeas de camundongo

Para o recrutamento folicular foram administrados 5 UI de Gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) - NOVORMON® - por via intraperitoneal nas fêmeas de camundongo em em qualquer fase do ciclo estral, fornecidas pelo Biotério Central da UFRJ. Após 46-48 horas dessa injeção, aplicou-se 5 UI de Gonadotrofina coriônica humana (hCG) - VETECOR® - também por via intraperitoneal, mimetizando-se o estímulo do pico de LH e ovulação. Em seguida, as fêmeas foram colocadas em contato com os machos durante a noite, para cópula. Na manhã seguinte, considerando-se dia 0,5, foi feita a verificação da presença de tampão seminal na região vaginal da fêmea, usado com indicativo positivo de cópula.

4.3.2. *Lavagem das tubas uterinas e obtenção dos embriões no estágio de 2 células*

A recuperação dos embriões foi realizada no dia 2,0 quando os embriões estão no estágio de duas células. Nesse estágio, os embriões encontravam-se na tuba uterina (figura 7), e para a coleta dos embriões foi realizada a retirada cirúrgica das tubas.

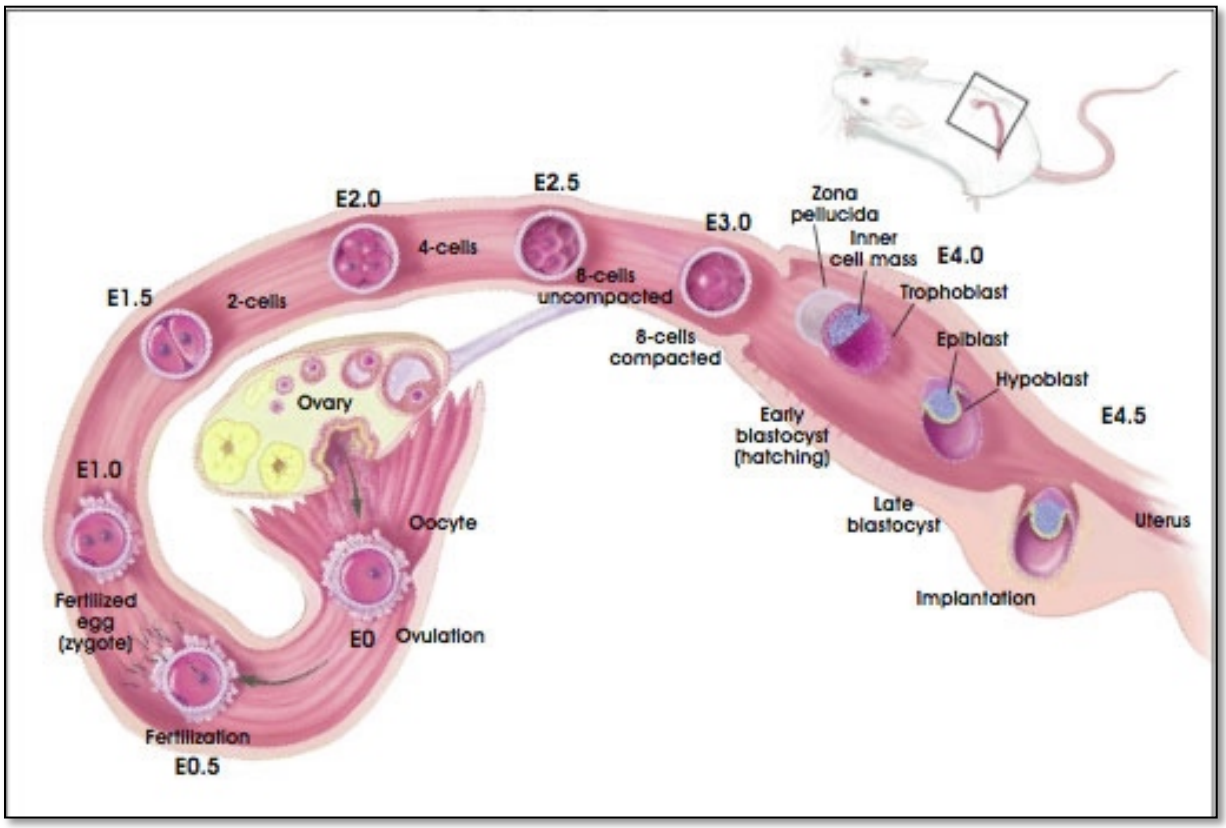

Figura 7: Fisiologia do desenvolvimento de embriões murinos, com comparação espaço-temporal dentro das tubas uterinas. Imagem disponível em: https://stemcells.nih.gov/info/2001report/appendixA.htm

As fêmeas foram anestesiadas com isoflurano dentro de uma câmara, para atingir estado de inconsciência e perda dos reflexos, e posteriormente submetidas à confirmação da eutanásia por método mecânico de deslocamento cervical. Realizou-se uma incisão peritoneal com o auxílio de dois jogos de tesouras e pinças para a visualização total do peritônio. Uma vez que o ovário e as tubas estavam expostos, as fímbrias da tuba uterina foram identificadas e a dissecção foi feita precisamente em sua extremidade. As tubas dissecadas foram colocadas em uma

placa de Petri de 100 mm contendo gotas de aproximadamente 0,5 ml do meio de fluido tubário humano modificado com gentamicina (mHTF, do inglês Modified Human Tubal Fluid Medium – Gentamicin) tamponado com suplementação de Soro Fetal Bovino em 10%. A lavagem foi feita sob observação de uma lupa, manipuladas em nova microgota com uma seringa de 26G. Durante esse procedimento realizou-se o rompimento e lavagem das estruturas tubárias e foi possível a visualização dos embriões de 2 células, após decantação dos mesmos para o fundo da gota.

Depois de retirados os debris celulares, os embriões foram avaliados quanto à sua integridade celular e apenas os embriões de duas células íntegros e com blastômeros simétricos foram incluídos nos experimentos (Figura 8).

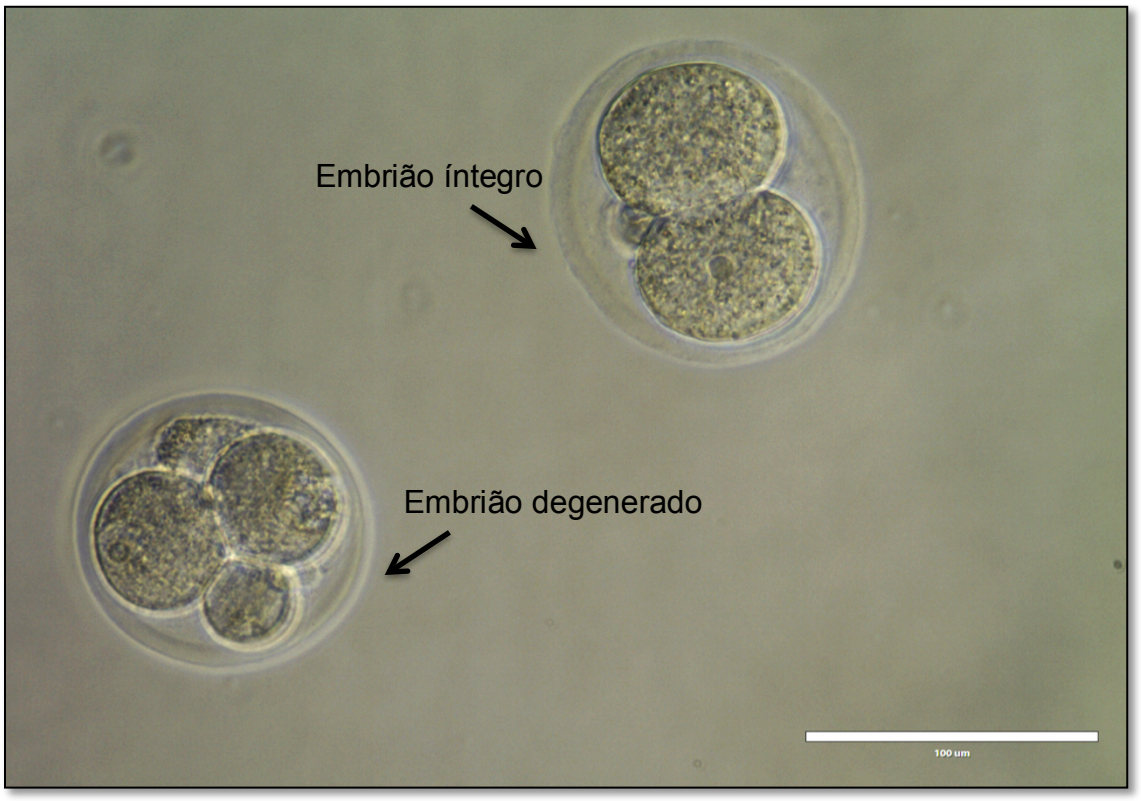

Figura 8: Embriões murinos. Dois embriões coletados no estágio de duas células demonstrando divergência entre a qualidade dos seus blastômeros. Fonte: Acervo pessoal da autora.

Os embriões selecionados foram transferidos da placa de lavagem para placa de cultivo, onde foram distribuídos randomicamente e às cegas por um segundo manipulador, em três condições distintas de cultivo (Figura 9): em meio GV-BLAST

suplementados com 20% SFB; cultivados em meio GV-BLAST 20% SFB em co-cultivo com células mesenquimais derivadas do sangue menstrual, (CeSAM); e em meio GV-BLAST 20% SFB condicionado do cultivo com CeSAM por 72 horas. Foram realizados oito experimentos, onde todos os embriões, em suas diferentes condições, foram cultivados em placa de poliestireno de 96 poços (Corning®), em incubadora à 37°C e 5% de CO_2., sendo observados no segundo dia de desenvolvimento do embrião e posteriormente no quinto dia, no seu possível estágio de blastocisto.

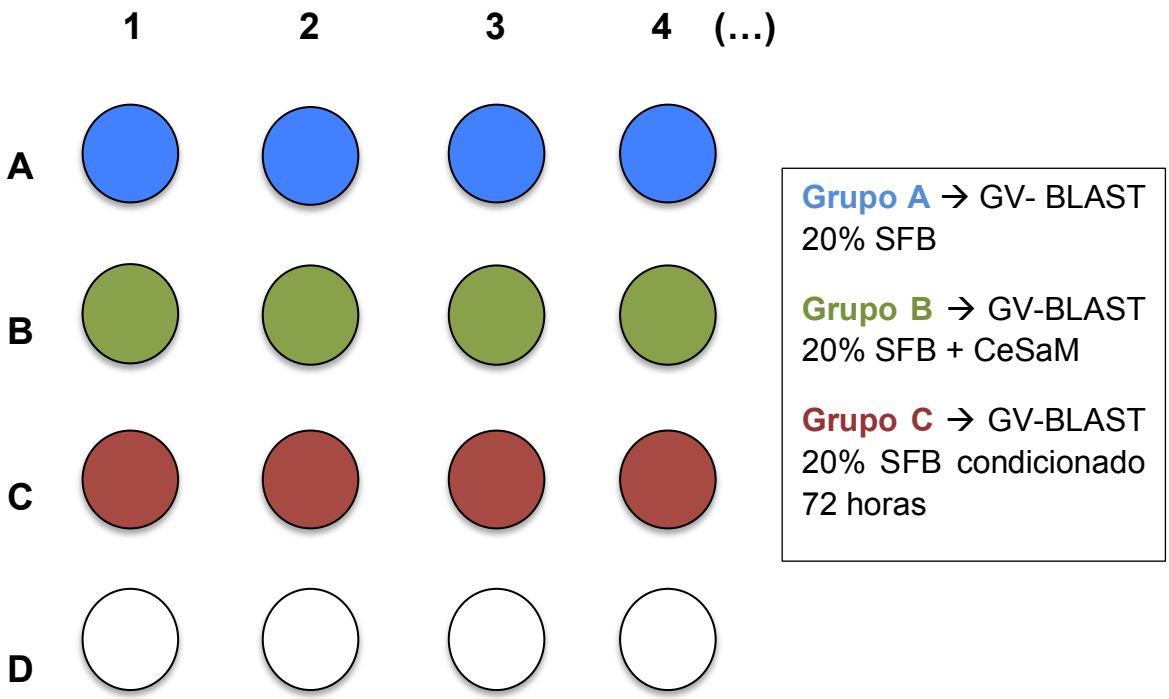

Figura 9: Esquema dos experimentos realizados. Esquematização do experimento com as três variações de micro ambiente de cultivo embrionário. Grupo A: cultivo dos embriões com GV-BLAST suplementado com 20% de soro fetal bovino; Grupo B: cultivo dos embriões em co-cultivo com as CeSaM; Grupo C: cultivo dos embriões com o meio condicionado.

4.3.3. Registro da evolução dos embriões do D2 ao D5 de desenvolvimento

Os embriões de camundongos obtidos em todas as coletas no estágio de 2 células foram distribuídos igualitariamente entre os três grupos do experimento. Os

poços continham o volume de 200 µl de meio de cultivo, independente da condição proposta ao grupo; e foram colocados 2-3 embriões em cada poço. Os embriões e as células foram fotografados com o microscópio invertido EVOS XL *Core Cell Imaging System* (ThermoFisher Scientific) no segundo e no quinto dia de evolução, em aumento de 40x, para posterior classificação morfológica dos embriões que atingiram o estágio de blastocisto, e avaliação morfológica das células (CeSAM) para confirmação da viabilidade das mesmas.

4.3.4. Classificação dos embriões

Ao final de 5 dias de desenvolvimento embrionário, os embriões foram avaliados quanto ao seu estágio de evolução. Os embriões que apresentaram bloqueio de desenvolvimento e/ou atraso de evolução foram caracterizados como ***degenerados***; enquanto aqueles que apresentaram características iniciais do estágio de blastocisto, como blastocele, massa celular interna e trofectoderma foram classificados como ***blastocistos***. Foi calculada e quantificada a taxa de blastocisto de cada grupo, assim como a porcentagem dos mesmos em cada experimento, de acordo com o número de embriões que foram coletados em cada procedimento.

4.3.5. Classificação dos blastocistos

Uma vez quantificados os blastocistos, os mesmos foram classificados de acordo com o seu grau de desenvolvimento. Considerou-se como Blastocisto Inicial aqueles que apresentavam blastocele ocupando mais que 50% do volume do embrião, zona pelúcida espessa e tamanha reduzido quando comparados aos blastocistos expandidos; como Blastocisto Expandido aqueles que apresentavam blastocele ocupando 100% do volume do embrião, aumento significativo do volume embrionário e diminuição da espessura da zona pelúcida; como Blastocisto em *Hatching* aqueles que apresentavam saída parcial do trofectoderma através da zona pelúcida; e como Blastocisto em *Hatching* Completo aqueles que encontravam-se completamente fora da delimitação da zona pelúcida. O grau de expansão e desenvolvimento dos blastocistos no quinto dia de cultivo foi utilizado como parâmetro de qualidade embrionária e qualidade do micro-ambiente em que aqueles blastocistos se encontravam ao desenvolver adequadamente e/ou de forma otimizada, seu metabolismo celular.

4.4. Análise estatística

Após a análise dos dados obtidos, e os valores da parte do todo, os resultados deste trabalho em relação à taxa de blastocisto e quantificação dos blastocistos obtidos em diferentes níves de expansão foram analisados através do teste estatístico de Qui-Quadrado, através do programa GraphPad Prism® versão 6.0 (Graphpad Software, Inc., USA). As diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. *Monocamada de CeSAM para co-cultivo*

As células mesenquimais utilizadas para o co-cultivo foram avaliadas 24 horas após o plaqueamento e também ao final de 96 horas de cultivo celular. Podemos observar na Figura 10 que as CeSAM aderiram na placa de cultura, apresentando inicialmente morfologia fibroblastóide, com células alongadas, ocupando a maioria da placa (Figura 10 – A e B) e expandindo-se de acordo com o tempo de co-cultivo (Figura 10 – C e D).

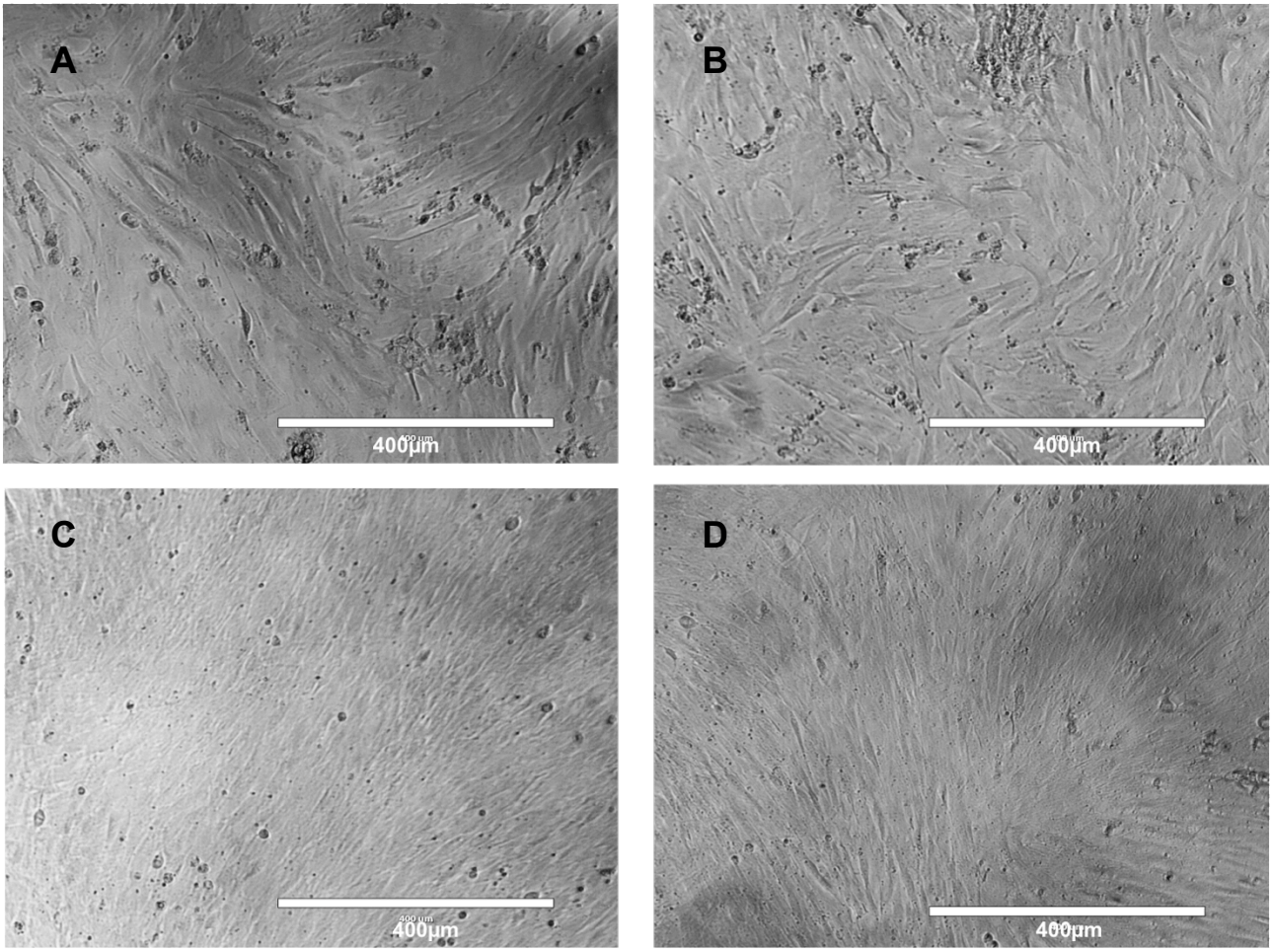

Figure 10: Fotomicrografia representativa da morfologia da monocamada de CeSAM no segundo e no quinto dia de cultivo celular. (A) e (B) células mesenquimais estromais do fluido menstrual CeSAM em cultura, 24 horas após serem plaqueadas, com formato alongado e núcleos elípticos. (C) e (D) respectivas células em cultura, 96 horas após serem plaqueadas. Imagens adquiridas por microscopia óptica de contraste de fase. Barra de calibração: 400µm.

A tabela 1 mostra a quantificação e taxa percentual do desenvolvimento de todos os embriões utilizados nos experimentos (n=8) deste estudo, representando como os mesmos chegaram ao quinto dia de cultivo.

Tabela 1. Taxas percentuais de blastocistos e embriões degenerados obtidos nos experimentos.

Parâmetros Avaliados	Total (n)	Taxa percentual (%)
Nº total de embriões de 2 células coletados	151	---
Nº total de blastocistos obtidos	68	45,0%
Nº de embriões degenerados	83	55,0%

Dados obtidos nas coletas de embriões de camundongos da linhagem Balb/c, durante o período de abril a setembro de 2017.

5.2 Quantificação de blastocistos em três microambientes de cultivo

Todos os grupos apresentaram blastocistos ao final de cinco dias de cultivo celular. O grupo controle, apresentou 30,0% de formação de blastocistos e 70,0% restante de embriões classificados como degenerados. A figura 11 e a tabela 2 mostram que o grupo de co-cultivo com CeSAM apresentou aumento da taxa de blastocisto em relação ao grupo controle (70,0%) e, consequentemente menor índice de embriões degenerados (30,0%). Já o grupo de meio condicionado em 72 horas mostrou características semelhantes ao grupo controle, com percentual de 33,3% de formação de blastocistos e 67,0% de embriões degenerados, conforme apresentado na tabela 2. Os dados são significativos com $p<0,05$.

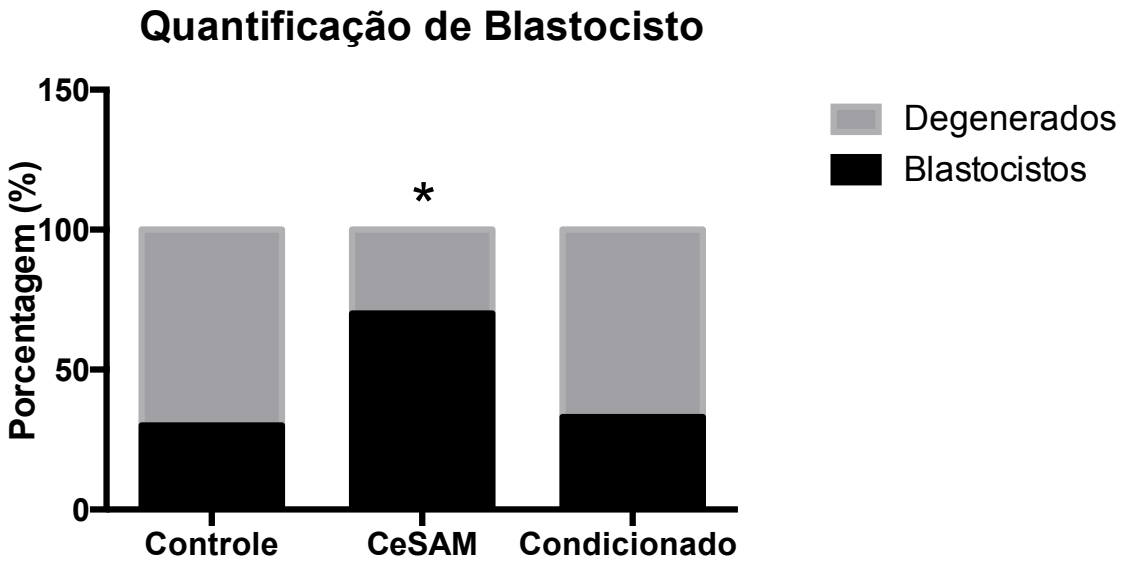

Figura 11: Gráfico demonstrativo da quantificação de embriões no estágio de blastocisto e embriões degenerados em cinco dias de cultivo. CeSaM: células mesenquimais estromais derivadas do fluido menstrual; Condicionado: meio condicionado com contato com CeSam por 72 horas. n embriões = 151. Valores expressos em percentual (%). * P<0,05.

Tabela 2: Taxas percentuais de blastocistos e embriões degenerados.

Condição de cultivo	Blastocistos	Degenerados
Controle	15/50 (30,0%)	35/50 (70,0%)
Cocultivo CeSaM	37/53 (70,0%)	16/53 (30,0%)
Condicionado (72hr)	16/48 (33,0%)	32/48 (67,0%)

CeSaM: células mesenquimais estromais derivadas do fluido menstrual, Condicionado: meio condicionado proveniente do contato com CeSam por 72 horas.

5.3. *Quantificação dos blastocistos em diferentes estágios de expansão*

Os blastocistos obtidos apresentaram diferentes graus de expansão, considerando os aspectos morfológicos do embrião. Foram obtidos blastocistos iniciais, expandidos, em “hatching” e que já haviam completado o “hatching” no quinto dia de desenvolvimento. A tabela 3 demonstra os valores absolutos e percentuais referentes à cada tipo de expansão dos embriões. Os diferentes níveis de diferenciação de blastocistos podem ser comparados nas figuras 11 a 13.

Tabela 3. Taxas percentuais de blastocistos obtidos em diferentes estágios de expansão celular.

Parâmetros avaliados	Total (n)	Taxa percentual (%)
Nº total de blastocistos obtidos	68	---
Blastos iniciais	24	35,3%
Blastos expandidos	16	23,5%
Blastos em Hatching	27	39,7%
Blastos com Hatching total	1	1,5%

Dados obtidos nas coletas de embriões de camundongos da linhagem Balb/c, durante o período de abril a setembro de 2017. Quantificação percentual dos blastocistos quanto aos seus diferentes estágios de expansão.

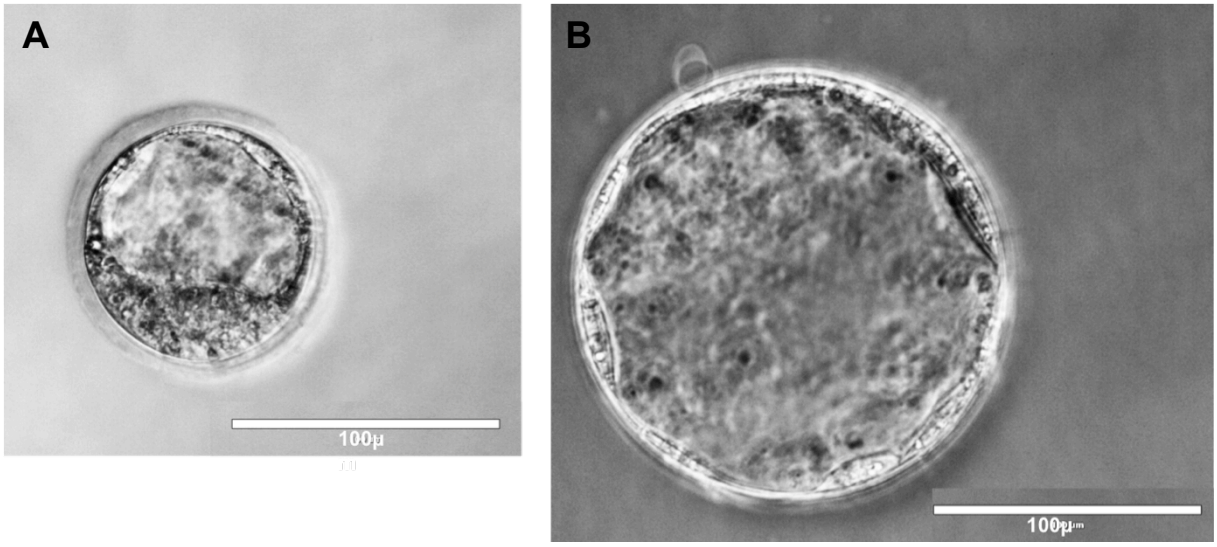

Figure 11: Fotomicrografias representativas de blastocistos em diferentes grau de expansão. (A) um blastocisto inicial e (B) um blastocisto expandido. Imagens adquiridas por microscopia de contraste de fase. Barra de calibração: 100µm.

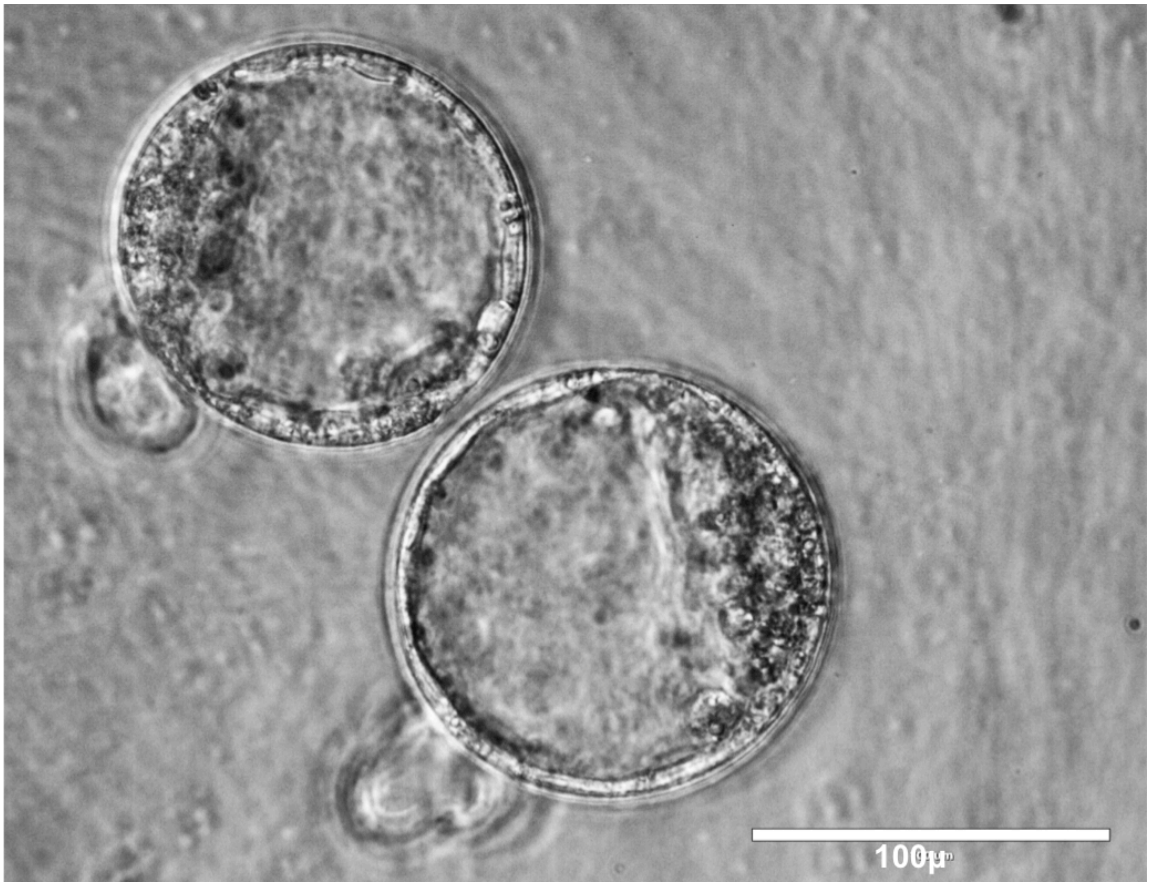

Figure 12: Fotomicrografia representativa de blastocistos realizando o *hacthing*, saindo da zona pelúcida, em co-cultivo com CeSaM. Imagem adquirida por microscopia óptica de contraste de fase. Barra de calibração: 100µm.

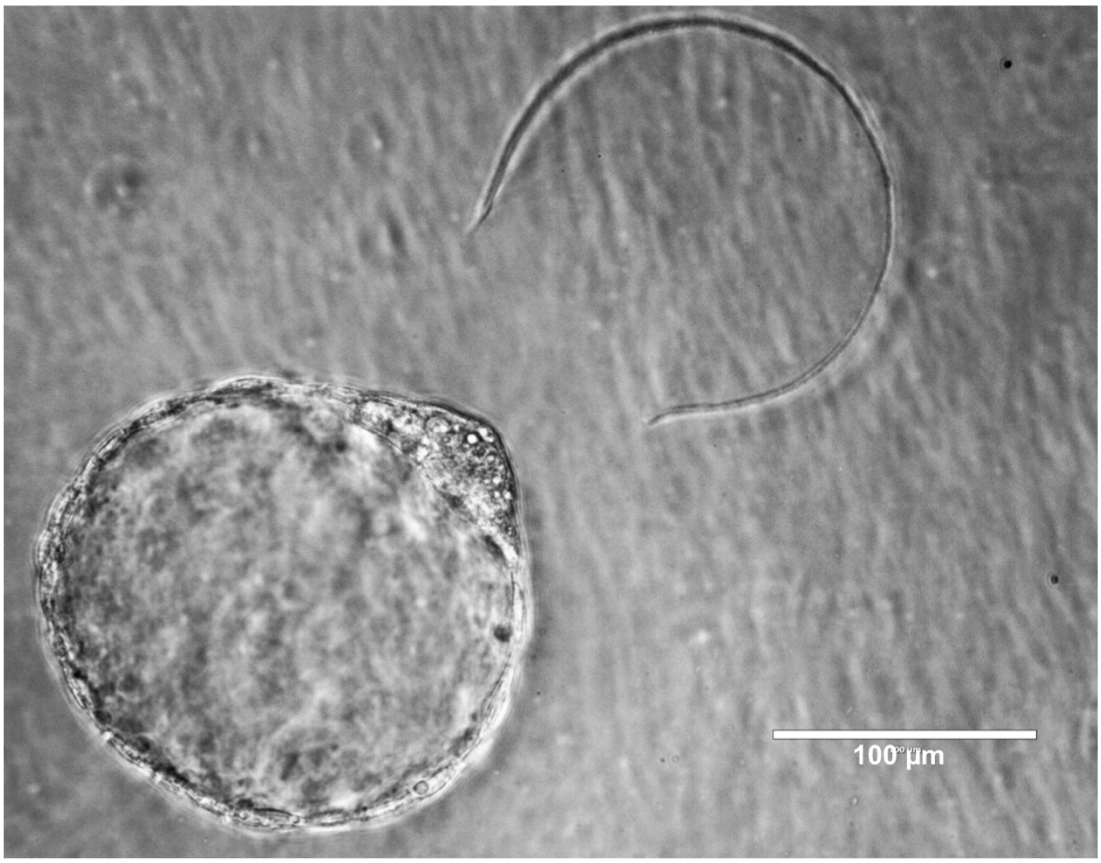

Figure 13: Fotomocrografia representativa de blastocisto com *hatching* completo, totalmente fora da zona pelúcida, em cocultivo com CeSAM. Imagem adquirida por microscopia óptica de fase. Barra de calibração: 100µm

5.4. *Quantificação dos blastocistos de acordo com o grau de expansão e microambiente de cultivo*

Os blastocistos obtidos apresentaram diferentes graus de expansão, considerando os aspectos morfológicos do embrião. O grupo controle e o grupo de cultivo em meio condicionado de 72 horas apresentaram a maioria dos embriões no estágio de blastocisto inicial, enquanto o grupo de cocultivo com CeSAM apresentou majoritariamente blastocistos em hatching e que já haviam realizado o hatching total. O gráfico representado na figura 14 apresenta os dados percentuais deste resultado.

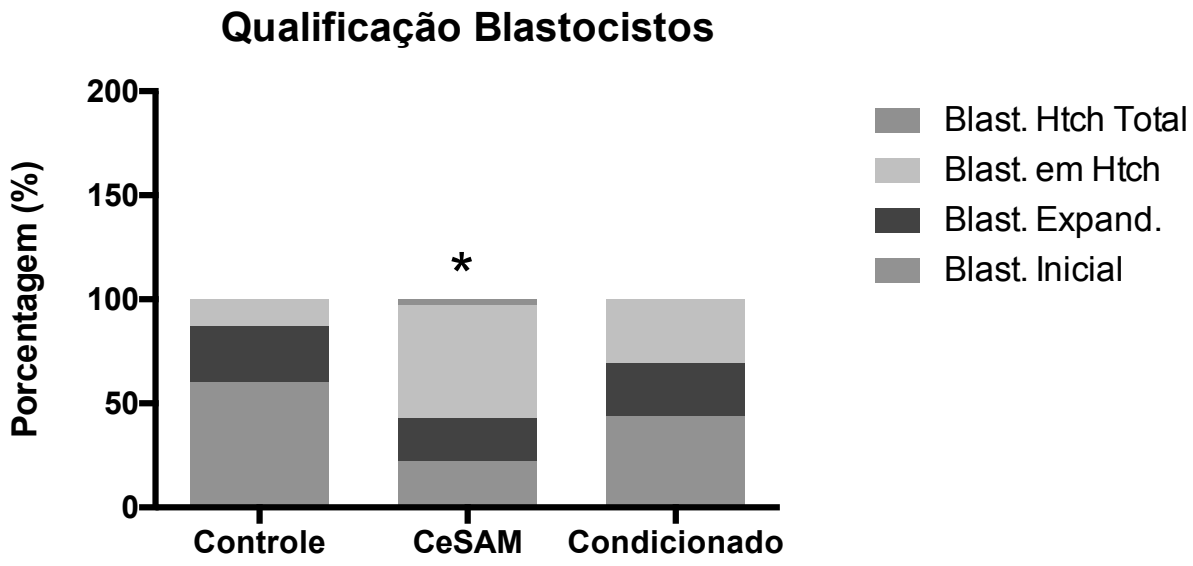

Figure 14: Gráfico demonstrativo da quantificação de de blastocistos em diferentes estágios de expansão em relação ao microambiente de cultivo. Valores expressos em percentual (%). n de blastocistos = 68. Blast. Inicial: Blastocisto inicial; Blast. Expand.: Blastocisto Expandido; Blast. Em Htch: Blastocisto em *hatching*; Blast. Htch Total: Blastocisto em *hatching* total. CeSaM: células mesenquimais estromais derivadas do fluido menstrual. Condicionado: meio condicionado proveniente do contato com CeSam por 72 horas. P<0,05.

Tabela 4. Taxas percentuais de blastocistos em diferentes estágios de expansão em relação ao microambiente de cultivo.

Condição de cultivo	Blastos iniciais	Blastos expandidos	Blastos em Htch	Blastos com Htch total
Grupo Controle	9/15 (60,0%)	4/15 (26,7%)	2/15 (13,3%)	0/15 (0,0%)
Grupo Cocultivo CeSaM	8/37 (21,6%)	8/37 (21,6%)	20/37 (54,1%)	1/37 (2,7%)
Grupo Cond. 72 h	7/16 (43,8%)	4/16 (25,0%)	5/16 (31,3%)	0/16 (0,0%)

Valores absolutos e taxas percentuais do estágio de expansão dos blastocistos obtidos de acordo com os diferentes microambientes após cinco dias de cultivo. Grupo Cocultivo CeSaM: grupo em que os embriões estavam sendo

cultivados com o cocultivo de CeSaM; Grupo Cond. 72 h: grupo em que os embriões estavam sendo cultivados com meio condicionado pelo contato com as CeSaM por 72 horas. Blastos Em Htch: Blastocisto em *hatching*; Blast. com Htch Total: Blastocisto em *hatching* total.

5.5. Levantamento de custos do protocolo de co-cultivo

Foi realizado o levantamento de custos necessários para obtenção, isolamento e manutenção das CeSaM em dois cenários distintos. O primeiro cenário é o caso das células serem cultivadas nos referentes centros de reprodução assistida em que a paciente está sendo submetido ao tratamento (tabela 5), mediante aprovação e certificação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que este local está apto a manipular e realizar a expansão de tal tipo celular. E o segundo cenário é o caso das células serem cultivadas em Centros de Terapia Celular (CTC), ambientes obrigatoriamente regularizados pelos órgãos de fiscalização da saúde) e posteriormente enviadas aos centros de reprodução já na passagem adequada, livre de contaminações e prontas para utilização em um protocolo de co-cultivo (tabela 6).

Tabela 5: Levantamento de custos do cultivo da CeSaM realizado em um centro de reprodução assistida e do tratamento homólogo de uma paciente, incluindo o procedimento de punção, cultivo embrionário e transferência dos embriões ao ambiente uterino.

Cultivo da CeSAM no centro de reprodução assistida	**Tratamento de RHA homólogo / paciente (punção, cultivo *in vitro* e transferência)**
Meio de cultivo DMEM HIGH	Meios de cultivo importados
Soro Fetal Bovino	Suplementação específica de cada meio
EDTA	Placas para punção e Placas para cultivo
Anfotericina	Pipetas descartáveis
Placa de 35 mm e Placas de 100 mm	Stripper e ponteiras específicas
Placa de 96 poços	Materiais descartáveis para manipulação dos gametas
Pipetas Transfer	Bomba de aspiração folicular e estrutura especializada do centro cirúrgico
Tubos de 15 ml e Criotubos	Agulhas de aspiração folicular
Pote coletor	Catéter de transferência
Tripsina, penicilina-estreptomicina	Ambiente com controle de qualidade do ar com filtros específicos
Manutenção de incubadoras, centrífugas, cabines de segurança e fluxo laminar.	Manutenção de incubadoras, microscópio invertido de micromanipulação, e cabines de segurança biológica
Congelamento e armazenamento das células para uso posterior	Mão de obra especializada
Manutenção dos materiais congelados	Estrutura de laboratório, centro cirúrgico, e ambiente com pressão negativa.
≅ R$600,00	**≅ R$12.000,00 - 14.000,00**

Tabela 6: Levantamento de custos do cultivo da CeSaM realizado em um Centro de Terapia Celular e do tratamento homólogo de uma paciente.

Cultivo da CeSAM proveniente de um Centro de Terapia Celular (CTC)	**Tratamento de RHA homólogo / paciente (punção, cultivo *in vitro* e transferência)**
Meio de Cultivo DMEM HIGH	Meios de cultivo importados
Soro Fetal Bovino	Suplementação específica de cada meio
EDTA	Placas para punção e placas para cultivo
Anfotericina	Pipetas descartáveis
Placa de 35 mm e Placas de 100 mm	Stripper e ponteiras específicas
Placa de 96 poços	Materiais descartáveis para manipulação dos gametas
Pipetas Transfer	Bomba de aspiração folicular e estrutura especializada do centro cirúrgico
Tubos de 15 ml e criotubos	Agulhas de aspiração folicular
Pote coletor	Catéter de transferência
Tripsina, Penicilina-Estreptomicina	Ambiente com controle de qualidade do ar com filtros específicos
Manutenção de incubadoras, centrífugas, cabines de segurança e fluxo laminar.	Manutenção de incubadoras, microscópio invertido de micromanipulação, e cabines de segurança biológica
Estrutura de laboratório, controle do ar, e ambiente com pressão negativa.	Mão de obra especializada
Congelamento e armazenamento das células para uso posterior	Estrutura de laboratório, centro cirúrgico, e ambiente com pressão negativa.
Manutenção dos materiais congelados	
≅ R$ 3.600,00	**≅ R$12.000,00 - 14.000,00**

Foram contabilizados os custos das ferramentas, produtos e serviços essenciais, como meios de cultivo, soluções específicas de cultivo, maquinário, congelamento e armazenamento das células. No caso das células provenientes dos CTCs, há a adição do custo de funcionamento e manutenção da infra-estrutura do local. Os itens foram precificados com valores atuais de 2018, e foi levado em consideração valores unitários para cultivo de células autólogas.

Em paralelo, foi contabilizado o orçamento de um tratamento padrão de centros de reprodução assistida, incluindo as etapas de punção folicular e cultivo embrionário até o estágio de potencial transferência dos embriões ao ambiente uterino. Foram consideradas ferramentas específicas como meio de cultivo, materiais obrigatoriamente descartáveis, maquinário especializado, manutenção mensal dos equipamentos, controle do ar e mão de obra altamente qualificada para realização dos procedimentos. Os itens de dimensão unitária e descartáveis foram precificados com valores atuais de 2018 e posteriormente somados aos gastos específicos de funcionamento e manutenção de um laboratório de reprodução assistida.

6. DISCUSSÃO

A utilização de CeSaM como camada alimentadora em um modelo de co-cultivo foi previamente estudado por Silva dos Santos em 2012. Neste trabalho, as CeSAM foram utilizadas para manter o estágio indiferenciado de células-tronco embrionárias com eficiência similar a camada alimentadora padrão utilizadas para esse tipo de cultivo celular. Essa estratégia, do contato da CeSAM com células embrionárias, ainda que no estágio indiferenciado, possibilitou a formulação da hipótese testada em nossos experimentos, indo de encontro com os resultados positivos obtidos por essa autora.

Considerando que os embriões humanos são expostos a fatores de crescimento oriundos da fisiologia feminina, presentes no percurso realizado durante a passagem na tuba uterina e permanência no útero, propõe-se que tais fatores desempenham um importante papel quanto a diferenciação dos primeiros estágios embrionários e posteriormente no crescimento do embrião até o estágio de feto (RICHTER, 2008). Tais fatores, com identificação ainda restrita diante da grande diversidade em que são secretados, tiveram suas funções reconhecidas e

atualmente já fazem parte da composição dos meios de cultivo comercializados para a área de reprodução assistida (RITCHER, 2008).

Apesar de não terem sido dosados no nosso estudo, já foi demonstrado que as CeSAM secretam fatores de crescimento como FGF-2, BMP4, TGF-β1, VEGF, PEDF, HGF e IGF-1. Esses fatores de crescimento não são exclusivos deste tipo celular, sendo também encontrados em outras derivações de camadas alimentadoras como a MEF (fibroblasto de embriões de camundongo), (SILVA DOS SANTOS, 2012; BORLOGAN et al, 2010; LIU et al, 2018). A liberação destes é indicativo de correlação positiva com os nossos resultados, que mostram maior taxa de blastocistos gerados e maior grau de expansão dos blastocistos no grupo de cultivo onde o microambiente estava sendo otimizado com o co-cultivo de CeSAM.

Recentemente, a derivação de CeSAM foi descrita minuciosamente, apresentando diversas características imunohistoquímicas, celulares, de concentração, passagens e diferenciação (LIU *ET AL*, 2018). Como visto também em nossos resultados, as passagens baixas (consideradas abaixo de P9) e a idade das doadoras, entre 25-35 anos, proporcionam a melhor ploriferação dessas células.

Ainda que o co-cultivo utilizado para aprimoramento do desenvolvimento embrionário tenha sido realizado com diversos tipos celulares previamente descritos, (BONGSO *et al*, 1989; WIEMER *et al* 1989; Seyed *et al*, 2009; Farouk, Vlad, 2009; CDR, Rebecca, 2000; Almodin *et al*, 1999 ; Bavister *et al*, 1995 ; Almodin *et al*, 2001) a utilização da CeSAM entra neste contexto como um método inovador e com a vantagem considerável de ser um recurso obtido por um método não invasivo, com facilidades éticas e a potenciabilidade de atender a uma demanda paciente-específico, funcionando de maneira autóloga.

Em nosso estudo o grupo controle apresentou taxa de formação de blastocisto de 30%. Essa taxa, a princípio, pode ser considerada baixa quando comparadas aos testes de validação dos meios de cultura comerciais. Nestes testes de validação são utilizados embriões de camundongo como ferramenta de padronização e espera-se uma taxa de blastocisto de 70 a 80% (MORBECK ET AL, 2014). Entretanto, as condições de cultivo que são utilizadas nestes estudos caracterizam-se geralmente pela utilização de soro de suplementação sintética,

distribuição de 10-12 embriões por gota, imersos em microgotas de 10-20µl, cultivados em placas de 35 mm e cobertos por óleo mineral (KATTAL et al, 2008). Considerando-se que nossos experimentos foram realizados em placa de 96 poços, com 200 µl de meio, soro fetal bovino e 2-3 embriões por poço, não podemos comparar nossas taxas com as obtidas nos testes de meio.

Outra característica do co-cultivo que pode representar mais um benefício do modelo estabelecido neste estudo, é a diminuição da rigidez da placa onde os embriões estão sendo cultivados. O autor Kolahi, em 2012, sugere que, a monocama celular que funciona como camada alimentadora nos modelos de co-cultivo promove um microambiente menos rígido e mais próximo da fisiologia uterina, mimetizando o contato célula-célula e assim otimizando a manutenção *in vitro* daqueles embriões (KOLAHI ET AL, 2012).

A cronologia adequada de desenvolvimento do embrião está intimamente ligada à sua qualidade e ao seu pontencial de implantação. Uma vez que embriões portadores de metabolismos adiantados ou atrasados são propensos à presença de aneuploidias, o conjunto de indícios morfológicos que devem ser observados em fases específicas do cultivo *in vitro* são parâmetros de qualidade confiáveis e amplamente utilizados como indicadores de desenvolvimento e ferramenta principal de escolha (KASER *ET* AL, 2018).

Os diferentes graus de expansão que o blastocisto pode apresentar estão correlacionados com o estágio da sua maturação e a eficácia metabólica das suas estruturas, conferindo aos embriões distintas classificações morfológicas em relação as suas estruturas e regulações celulares e moleculares (CHENG-HE YU *ET AL,* 2018; SESHAGIRI *ET AL*, 2009). Ao final de cinco dias de desenvolvimento, os blastocistos saudáveis se encontram no grau de expansão expandido, ou em *hatching* parcial (KASER ET AL, 2018). O microambiente de co-cultivo, que apresentou em maior quantidade os embriões em *hatching* e até mesmo com *hatching* total, pode ser considerado o ambiente mais otimizado dentre os três tipos de cultivo que estavam sendo realizados, enfatizando assim, a nossa hipótese de enriquecimento do microambiente através do co-cultivo com as CeSAM.

Apesar da utilização do meio condicionado fazer parte de uma hipótese que os fatores liberados pela CeSAM seriam suficientes para proporcionar um micro

ambiente mais otimizado para os embriões, nota-se que o grupo com contato célula-célula obteve maior quantidade de blastocistos e maior grau de expansão dos mesmos. Nossos resultados reafirmam que, como proposto por Bongso *et al*, 1991, além dos fatores liberados no meio de cultivo, o contato embrião-célula é necessário para conexões celulares entre a zona pelúcida e as “células alimentadoras”, para que possa ser realizada a troca cruzada de glicoproteínas e outros metabólitos.

O custo de um tratamento de reprodução assistida pode variar muito diante da realidade de cada paciente. Tratando-se de um ciclo a fresco, onde não há necessidade de congelamento dos gametas, o custo médio do tratamento no Brasil fica em torno de quatorze mil reais, quando convertidos do valor do dólar (CHAMBERS et al, 2013). Custos adicionais podem ainda ocorrer, diante da necessidade de doação de gametas femininos ou masculinos (SAUER, 2013), análises genética dos embriões (COLLINS et al, 2017) ou gestações múltiplas (CHAMBERS et al, 2007). O levantamento de custos realizado neste estudo vai de encontro com os dados encontrados na literatura em relação aos orçamentos de tratamentos de reprodução assistida no Brasil (CHAMBERS et al,2013).

O cultivo isolado da CeSAM apresentou dois possíveis orçamentos referentes ao protocolo de co-cultivo. Quando proveniente de CTC, as células estarão sendo manipuladas em ambiente estritamente controlado, conforme o controle de qualidade dos laboratórios pertencentes à Rede Nacional de Terapia Celular (RNTC, 2018) e por isso, representa uma adição monetária diante do orçamento do cultivo da CeSaM. Já nos casos de centros de reprodução aptos à manipulação das CeSaM, o valor adicional para a utilização do protocolo sugerido neste estudo é menor, devido ao aproveitamento da infra-estrutura especializada e controle ambiental já existente.

Mesmo caracterizando-se por uma quantia maior de dinheiro, o protocolo envolvendo as células provenientes dos CTC ainda representa uma opção alternativa de menor investimento monetário quando comparados à tentativas de não sucesso e gastos indiretos do tratamento (CHAMBERS, et al 2007). Sendo assim, o âmbito financeiro não parece representar uma limitação para a possível implementação deste procotolo como metodologia alternativa, opcional e complementar.

Reunindo todos os resultados e diante da inovação da utilização das CeSAM com esse propósito, acreditamos que o protocolo desenvolvido nos experimentos desde trabalho tem potencial de utilização em centros de reprodução assistida como um produto complementar aos tratamentos, pois o processo estabelecido propõe otimizar o microambiente de cultivo de forma autóloga; tem a proposta de ser de fácil acesso, uma vez que todos os materiais necessários para o co-cultivo não são específicos para este fim e podem ser encontrados em um laboratório de reprodução assistida e não representa um incremento de custo considerável diante do orçamento de um ciclo reprodutivo assistido.

7. CONCLUSÕES

O protocolo de co-cultivo realizado com as CeSAM foi estabelecido com sucesso e alta eficiência.

As CeSaM são capazes de otimizar um microambiente de cultivo, beneficiando o desenvolvimento embrionário.

O meio condicionado pelo cultivo prévio com as CeSaM não favoreceu o desenvolvimento embrionário quando comparado ao grupo controle.

O co-cultivo com CeSaM pode representar uma aplicação inovadora dos modelos de co-cultivo no universo da reprodução assistida. Na época em que esses modelos foram abordados, as CeSaM ainda não se apresentavam viáveis e bem estabelecidas, enquanto hoje, representam uma alternativa em potencial.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMODIN C.G., PEREIRA L.A., MINGUETTI-CÂMARA V.C. Co- cultura de embriões humanos em células Vero e transferência em fase de blastocisto. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** 21: 409-15, 1999.

ALMODIN, C. G., MINGUETTI-CÂMARA, V. C., PEREIRA, L. A.C. Cultura de Embriões até o Estágio de Blastocisto: Comparação entre o Uso de Meios Seqüenciais e de Co-Cultura Embryo Culture to Blastocyst Stage: Comparison Using Sequential Medium and Coculture. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** v. 23, nº 9, 2001.

ANDRADE, A., PINTO, S. C., OLIVEIRA, R. S. (organizadores). **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388p.

AOKI, V.W. Comparison of four media types during 3-day human IVF embryo culture. **Reproductive BioMedicine Online**, vol.10, no. 5, pp.: 600-6, 2005.

AYUMI H., KEIJI M., HIROKI I., YOSHIHIRO N., TAMAO E., GEN W., ATSUO O. High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization. **The Society for the Study of Reproduction,** vol. 10, no 1095, 2015.

BAVISTER B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update** p: 1:91-148,1995.

BIRKENFELD, A. & NAVOT, D. J. Endometrial Cultures and Their Application to New Reproductive Technologies: A Look Ahead. **Journal of in Vitro Fertilization and Embryo Transfer,** Vol. 8, No. 3, 1991.

BONGSO A., FONG C.Y., NG S.C., RATNAM S. The search for improved *in-vitro* systems should not be ignored: embryo co-culture may be one of them. **Human Reproduction** v.8, pp. 1155-1162, 1993.

BONGSO A., NG S.C., FONG C.Y., RATNAM S. Cocultures: a new lead in embryo quality improvement for assisted reproduction. **Fertility and Sterility** v.56, pp. 179-191, 1991.

BONGSO, A., NG, S.C., SATHANANTHAN, A.H. *et al.* Improved quality of human embryos when co-cultured with human ampullary cells. **Human Reproduction** pp: **4**, 706–713, 1989.

BORLOGAN, C. V.; KANEKO, Y. MAKI, M. YU, S. J.; ALI, M. ALLICKSON, J. G.; SANBERG, C. D.; KUZMIN-NICHOLS, N., SANBERG, P. R. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotectin following transplantation in experimental stroke. **Stem Cells Dev.** V. 19, n.4, pp 439-452,

2010.

BORLONGAN, C., KANEKO, V .Y., MAKI,M., YU, S.J., ALI, M., ALLICKSON, J.G., SANBERG, C.D., KUZMIN-NICHOLS, N., SANBERG, P.R. Menstrual blood cells display stem cell-like phenotypic markers and exert neuroprotection following transplantation in experimental stroke. ***Stem Cells Dev***., vol. 19, no**.** 4, pp.:439-452, 2010.

BRAGGIO, M. M.; MARTINS, A. R. S.; VALERO, V. B. Influência do manejo na produtividade e no desenvolvimento de camundongos (*Mus musculus*). **Arquivos do Instituto Biológico**, 70 (2):169-173, 2003.

ESCHIN, I.I., RIBAS, M. H., CESCHIN, A. P., NISHIKAWA, L. ROCHA, C. C., PIC-TAYLOR, A. BARONEZA, J. E. A prospective randomized study comparing two commercially available types of human embryo culture media: G1-PLUSTM/ G2-PLUSTM sequential medium (Vitrolife) and the GL BLAS TTM sole medium (Ingamed). **Journal of Brazilian Assisted Reproduction**. 20(1):23-26 , 2016.

Centro de Criogenia Brasil, CCB. 2018. Site oficial https://ccb.med.br/texto/celula-tronco-hematopoietica acessado em 09/08/2018.

CHAMBERS G.M., CHAPMAN M.G., GRAYSON N., SHANAHAN M., SULLIVAN E.A. Babies born after ART treatment cost more than non-ART babies: a cost analysis of inpatient birth-admission costs of singleton and multiple gestation pregnancies. **Human Reproduction** v.22, pp.3108-15, 2007.

CHAMBERS, M. G. , ADAMSON, D. G. AND EIJKEMANS, M. J. C. Acceptable cost for the patient and society. **Fertility and Sterility** v. 100, n. 2, 2013

CHAN, R. W. S., SCHWAB K. E., & GARGETT, C. E. Clonogenicity of human endometrial epithelial and stromal cells ***Biology of Reproduction*** vol. 70, no. 6, pp.: 1738–1750, 2004.

COLLINS, S.C. , XU, X.1 & MAK, W. Cost-effectiveness of preimplantation genetic screening for women older than 37 undergoing in vitro fertilization. **Journal of Assisted Reproduction Genetics**. v.34. i.11 pp.1515-1522, 2017.

COSSIELLO, R.D.F., AGGELIS, A., FAÚNDES, D., PETTA, C.A. Morphological differences in human zygotes and embryos cultured in different media. **Zygote** vol. 20, no. 4, pp.: 399-405, 2012.

COWAN, C.A. et al. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. **New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 13, p. 1353-1356. 2004.

DEEKSHYA, S., XIAOLIN, L., HUAI, L. F. Comparison of different stimulation protocols used in in vitro fertilization: a review. **Annals of Translational Medicine**, vol.3, no.10, pp.: 137, 2015.

FAROUK, F. N. O. e VLAD, M. *In Vitro* Development of Mouse Pronuclear Embryos to Blastocysts in Sequential Media With and Without Co-Culture of Autologous Cumulus Cells. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** pp: 26:129–135, 2009.

FOWLER R.E., EDWARDS R.G. Induction of superovulation and pregnancy in mature mice by gonadotrophins. **The Journal of endocrinology**, Vol.15, no 4,pp.:374–84, 1957.

FRAGA, A. M. et al. Establishment of a Brazilian line of human embryonic stem cells in defined medium: implications for cell therapy in an ethnically diverse population. **Cell transplantation**, v. 20, n. 3, p. 431-440. 2011.

FRIEDENSTEIN, A. J., J. F. GORSKAJA, *et al*. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopietic organs. **Exp Hematol** 4 (5): 267-74, 1976.

GARDNER, D. K.; LANE, M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. **Biology of reproduction**, [S.l.], v.48, p.377 – 85, 2 1993.

GARDNER, D.K., LANE, M. Towards a single embryo tranfer. **Reproductive BioMedicine Online**, vol.6, no.4, pp.: 470-81, 2003.

GARDNER, D.K., LANE, M., BATT, P. Uptake and metabolism of pyruvate and glucose by individual sheep preattachment embryos developed in vivo. **Molecular Reproduction Development**, vol.36, no. 3, pp.: 313-19, 1993.

GARDNER, D.K., LANE, M., CALDERON, I., LEETON, J. Environment of the preimplantation human embryo in vivo: metabolite analysis of oviduct and uterine fluids and metabolism of cumulus cells. **Fertility and Sterility**, vol. 65, no. 2, pp.: 349-53, 1996.

GILBERT ET AL. Genetic mouse embryo assay: improving performance and quality testing for assisted reproductive technology (ART) with a functional bioassay. Reproductive Biology and Endocrinology v.14, p13, 2016.

GIRITHARAN, G., TALBI, S., DONJACOUR, A., SEBASTIANO, F.D., DOBSON, A.T., RINAUDO, P.F. Effect of in vitro fertilization on gene expression and development of mouse preimplantation embryos. **Reproduction** vol. 134, no 1, pp.:63-72, 2007.

HARRY H., QIN, C. F., SONG S., SHARON L., ANIL D., ROBIN D. Hughes Hypoxic preconditioning potentiates the trophic effects of mesenchymal stem cells on co-cultured human primary hepatocytes. **Stem Cell Research & Therapy**, vol.6, pp.:237, 2015.

HASEGAWA,A.; MOCHIDA, K.; INOUE, H., NODA, Y., ENDO, T., GEN WATANABE, G.; OGURA, A. High-Yield Superovulation in Adult Mice by Anti-Inhibin Serum Treatment Combined with Estrous Cycle Synchronization. **The**

Society for the Study of Reproduction, 2015.

HIDA, N., NISHIYAMA, N., MIYOSHI, S., KIRA, S., SEGAWA, K., UYAMA, T., MORI, T., MIYADO, K., IKEGAMI, Y., CUI, C., *et al*. Novel cardiac precursor-like cells from human menstrual blood-derived mesenchymal cells. ***Stem Cells***, vol. 26, no. 7, pp.:1695-1704, 2008.

HU X, WANG J, LI Y, WANG Y, DING C, ZENG Y, ET AL. Clinical Considerations of Preimplantation Genetic Diagnosis for Monogenic Diseases. **PLoS ONE** 10(9), e0139613, 2015.

HU, X., WANG, J., LI, Y., WANG, Y., DING, C., ZENG, Y., et al. Clinical Considerations of Preimplantation Genetic Diagnosis for Monogenic Diseases. **Plos One**, vol.10, no.9, 2015. **Human Reproduction Updat.** v.20, n.5 pp. 617–631, 2014.

IKEGAMI, Y., MIYOSHI, S., NISHIYAMA, N., HIDA, N., OKAMOTO, K., MIYADO, K., SEGAWA, K., OGAWA, S., UMEZAWA, A. Serum-independent cardiomyogenic transdifferen- tiation in human endometrium-derived mesenchymal cells. ***Artif. Organs***, vol. 34, no. 4, pp.: 280-288, 2010.

JIN, J., PAN, C., FEI, Q., NI, W., YANG, X., ZHANG, L., HUANG, X. Effect of sperm DNA fragmentation on the clinical outcomes for in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection in women with different ovarian reserves. **Fertility and Sterility,** vol. 103, no. 4, 2015.

JONHSON, A., L. RAFF, *et al*. Development of Multicellular Organisms. **Molecular Biology of the Cell**. 4th ed., Artmed. 2004.

KAMEL, R.M.A. Assisted Reproductive Technology after the birth of Louise Brown. **Gynecoly & Obstetrics**, vol. 3, pp.: 156, 2013.

KASER, D. J., RACOWSKY, C. Clinical outcomes following selection of human preimplantation embryos with time-lapse monitoring: a systematic review. **Human Reproduction Update**, Vol.20, No.5 pp. 617–631, 2014.

KATTAL, N., COHEN, J. AND BARMAT, L.I. Role of coculture in human in vitro fertilization: a meta-analysis. **Fertility and Sterility** v. 90, n. 4, 2008.

KIRKEGAARD, K., AGERHOLM, I. E. E INGERSLEV, H. J. Time-lapse monitoring as a tool for clinical embryo assessment. **Human Reproduction**, v.27, n.5, pp. 1277–1285, 2012.

KOMSKY-ELBAZ, A., RAZIEL, A., FRIEDLER, S., STRASSBURGER, D., KASTERSTEIN, E., KOMAROVSKY, D., RON-EL, R., BEN-AMI, I. Conventional IVF versus ICSI in sibling oocytes from couples with endometriosis and normozoospermic semen. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics,** vol. 30, pp.: 251–257, 2013.

KOVACS, P. Embryo selection: the role of time-lapse monitoring, **Reproductive**

Biology and Endocrinology, vol. 12, pp.:124, 2014.

KUPIS, L. DOBROŃSKI, P.A., RADZISZEWSKI, P. Varicocele as a source of male infertility – current treatment techniques. **Central European Journal of Urology**, vol. 68, pp.:365-70, 2015.
LA SALA, G.B., ALESSIA, N., FORNACIARI, E., FALBO, A., RONDINI, I., MORINI, D., VALLI, B., VILLANI, M.T., PALOMBA, S. Intracytoplasmic morphologically selected sperm injection versus conventional intracytoplasmic sperm injection: a randomized controlled trial. **Reproductive Biology and Endocrinology**, vol. 13, no. 97, 2015.

LANE, M.; GARDNER, D. K. Embryo culture medium: which is the best? Best practice & research. **Clinical obstetrics & gynaecology**, [S.l.], v.21, p.83 – 100, 11 2006.

LEESE, H. J. et al. Early human embryo metabolism. **Bioessays**, S.1 v.5, n.4, p.259-264, 1993.

LI, H.Y., CHEN, Y.J., CHEN, S.J., KAO, C.L., TSENG, L.M., LO, W.L., CHANG, C.M., YANG, D.M., KU, H.H., TWU, N.F., *et al*. Induction of insulin-producing cells derived from endometrial mesenchymal stem-like cells. ***Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics***, vol. **335**, no. 3, pp.:817-829, 2010.

MARTIN, K.L. Nutritional and metabolic requirements of early cleavage stage embryos and blastocysts. **Human Fertility**, vol. 3, no.2, pp.: 247-54, 2000.

MASTENBROEK, S., TWISK, M., van ECHTEN-ARENDS, J., SIKKEMA-RADDATZ, B., KOREVAAR, J.C., VERHOEVE, H.R., VOGEL, N.E, ARTS, E.G., de VRIES, J.W., BOSSUYT, P.M., BUYS, C.H., HEINEMAN, M.J., REPPING, S., van DER VEEN, F. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. **New England Journal of Medicine**, vol. 357, pp.: 9–17, 2007.

MAURI, A.L., PETERSEN, C.G., BARUFFI, R.L., FRANCO JR, J.G. A prospective, randomized comparison of two commercial media for ICSI and embryo culture. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, vol. 18, no.7, pp.: 378-81, 2001.

MOU, X-Z. , LIN, J., CHEN, J-Y. , LI, Y-F. , WU, X-X. , XIANG B-Y. , LI C-Y. , MA, J-M. & XIANG, C. Menstrual blood-derived mesenchymal stem cells differentiate into functional hepatocyte-like cells ***Journal of Zhejiang University-Science B. (Biomedicine & Biotechnology*)** vol. *14,* no.11, pp. 961-972, 2013.

MURPHY, M.P., WANG, H., PATEL, A.N., KAMBHAMPATI, S., ANGLE, N., CHAN, K., MARLEAU, A.M., PYSZNIAK, A., CARRIER, E., ICHIM, T.E., *et al*. Allogeneic endometrial regenerative cells: an off the shelf solution for critical limb ischemia? ***J. Transl. Med***., vol. 6, no.1, pp.:45, 2008.

NAOKO H., NOBUHIRO N., SHUNICHIRO M., SHINICHIRO K., KAORU S., TARO U., TAISUKE M., KENJI M. *et al.* Novel Cardiac Precursor-Like Cells from Human Menstrual Blood-Derived Mesenchymal Cells. **Stem Cells**, vol. 26, pp.:1695–1704, 2008.

OMAR FAROUK, F. N., VLAD, M**.** *In Vitro* Development of Mouse Pronuclear Embryos to Blastocysts in Sequential Media With and Without Co-Culture of Autologous Cumulus Cells**. Journal of Reproduction and Development**, v. 54, n.5, 2008.

OMBELET, W., ROBAYS, J.V. Artificial insemination history: hurdles and milestones. **Facts Views Vis Obgyn**, vol. 7, no.2, pp.: 137-143, 2015.

PASQUALOTTO F.F. et al. - Measuring male infertility: epidemiological aspects. **Revista Hospital das Clínicas Faculdade de Medicina de São Paulo v.58 p**3: 173-178, 2003.

PEÑA F., DÁVALOS, R., RECHKEMMER, A., ASCENZO, A., GONZALES, M. Embryo development until blastocyst stage with and without renewal of single medium on day 3. **JBRA Assisted Reproduction** 00, 2017.

PUREWAL, S., CHAPMAN, S. C. E. , VAN DEN AKKER, O. B. A. Depression and state anxiety scores during assisted reproductive treatment are associated with outcome: a meta-analysis **Reproductive Biomedicine Online, v.0, 2018.**

RAIMUNDO, J. M. Ordem dos Revisores Oficiais de Portugal, **Revista Revisores e Auditores** vol.3, cap. Saúde, 2015. http://www.oroc.pt/fotos/editor2/Revista/71/Saude.pdf acessado em 29/04/2108.

RAY, A., SHAH, A. , GUDI, A. , HOMBURG, R. Unexplained infertility: an update and review of practice. **Reproductive Healthcare Ltd**, pp. 591-593, 2012.

REBECCA, C.D.R. History and Characterization of the Vero Cell Line. **Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting**. Maio/12, 2000.

RICHTER, K. S. The importance of growth factors for preimplantation embryo development and in-vitro culture. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, [S.l.], v.20, p.292 – 304, 5 2008.

RNTC, **Rede Nacional de Terapia Celular**. Site oficial http://rntc.org.br acessado em 09/08/2018.

ROUFOSSEAND, C., COOK, H.T. Stem cells and renal regeneration. **Nephron—Experimental Nephrology**, vol. 109, no. 2, pp. e39–e45, 2008.

RUSSELL, W.M.S. The Three Rs: Past, Present and Future. **Animal Welfare**, vol. 14, pp.:279–86, 2005.

SAHARKHIZ, N., NIKBAKHT, R., SALEHPOUR, S. Comparison between conventional blind embryo transfer and embryo transfer based on previously measured uterine length. **International Journal of Fertility and Sterility**, vol. 8, no. 3, 2014.

SANBERG, P.R., EVE, D.J., WILLING, A.E., GARBUZOVA-DAVIS, S., TAN, J., SANBERG, C.D., ALLICKSON, J.G., CRUZ, L.E., BORLONGAN, C.V. The treatment of neurodegenerative disorders using umbilical cord blood and menstrual blood-derived stem cells. ***Cell Transplant***, vol. 20, no. 1, pp.:85-94, 2011.

SANTAMARIA, X., MASSASA, E.E., FENG, Y., WOLFF, E., TAYLOR, H.S. Derivation of insulin producing cells from human endometrial stromal stem cells and use in the treatment of murine diabetes. ***Molecular Therapy***., vol. 19, no.11, pp.: 2065-2071, 2011.

SAUER M.V., editor. Principles of oocyte and embryo donation. London: Springer-Verlag; 2013.

SCIORIO, R., THONG, J.K. & PICKERING, S.J. **Journal of Assisted Reproduction Genetics** v.35 pp.515, 2018.

SCIORIO, R., THONG, J.K., PICKERING, S. J. Comparison of the development of human embryos cultured in either an EmbryoScope or benchtop incubator. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**. pp: 1-18, 2017.

SEYED N. N-M., PAHANG, H., MOSHKDANIAN, G., NEMATOLLAHI-MAHANI, A. Effect of embryonic fibroblast cell co-culture on development of mouse embryos following exposure to visible light. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** p: 26:129–135, 2009.

SILVA dos SANTOS, D., Oliveira, V.C.C., ASENSI, K.D**.,** VAIRO, L., CARVALHO, A.B., CARVALHO, A.C.C., GOLDENBERG, R.C.S. Human Menstrual Blood Derived Mesenchymal Cells As New Human Feederlayer System For Human Embryonic Stem Cells. **Cell Medicine** part B, vol. 1, pp.: 1, 2014.

SOTIROSKA, V., PETANOVSKI, Z., DIMITROV, G., HADJI-LEGA, M., SHUSHLESKI, D., SALTIROVSKI, S., MATEVSKI, V., SHENBAKAR, S., PANOV, S., JOHANSSON, L. The day of embryo transfer affects delivery rate, birth weights, female-to-male ratio, and monozygotic twin rate. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology**, vol. 54, pp.:716-21, 2015.

SURREY, E.S. Endometriosis-Related Infertility: The Role of the Assisted Reproductive Technologies. **BioMedical Research International,** vol.2015, artigo 482959, 8 pp., 2015.

TAKEO T., NAKAGATA, N. Superovulation Using the Combined Administration of Inhibin Antiserum and Equine Chorionic Gonadotropin Increases the Number of Ovulated Oocytes in C57BL/6 Female Mice. **PLoS ONE** 10(5): e0128330, 2015.

TAMADON, A. JAHROMI, A. R. Rahmanifar, F., AYASEH, M., KOOHI-HOSSEINABADI, O., MOGHIMINASR, R. Histomorphometric Evaluation of Superovulation Effect on Follicular Development after Autologous Ovarian Transplantation in Mice. **Veterinary Medicine International**, vol. 2015, artigo

236436, 7 pp, 2015.

TARÍN J. J., GÓMEZ- PIQUER, V., PEREZ-ALBALÁ, S., HERMENEGILDO, C., CANO, A. Predictive variables of in vitro fertilization and pre-implantation embryo development in the mouse, **Molecular Reproduction and Development** vol. 63, no. 1, pp.: 38–46, 2002.

Thomson, A.J., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., Jones, J. M. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. **Science** v. 282, no. 5391, pp. 1145-1147, 1998.

THOUAS, G.A., KORFIATIS, N.A., FRENCH, A.J., JONES, G.M., TROUNSON, A.O. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts, **Reproductive Biomedicine Online**, vol.3, pp.: 25–29, 2001.

TORRES-PADILLA, M. E. Mini-Review: Developments in reproductive biology and medicine. **Human Reproduction** 23 (6): 1246-1252, 2008.

TORU T., NAOMI N. Superovulation Using the Combined Administration of Inhibin Antiserum and Equine Chorionic Gonadotropin Increases the Number of Ovulated Oocytes in C57BL/6 Female Mice **Plos One,** vol.10. no. 1371, 2015.

VAJTA, G. et al. Embryo culture: can we perform better than nature? **Reproductive biomedicine online**, [S.l.], v.20, p.453 – 69, 3 2010.

VERFAILLIE, C. M. Adult stem cells: assessing the case for pluripotency. **Trends in cell biology**, [S.l.], v.12, p.502 – 508, 11 2002.

VERGOUW, C.G., KIESLINGER, D.C., KOSTELIJK, E.H., BOTROS, L.L., SCHATS, R., HOMPES, P.G., SAKKAS, D., LAMBALK, C.B. Day 3 embryo selection by metabolomic profiling of culture medium with near-infrared spectroscopy as an adjunct to morphology: a randomized controlled trial. **Human Reproduction** vol. 27, pp.: 2304–2311, 2012.

WIEMER K.E., COHEN J., WIKER S.R., MALTER H.E., WRIGHT G., GODKE R.A. Coculture of human zygotes on fetal bovine uterine fibroblasts: embryonic morphology and implantation. **Fertility Sterility** 52:503-8, 1989.

WUNDERA, D., BALLABENIB, P., ROTH-KLEINERC, M., PRIMIA, M.P., SENND, A., CHANSOND, A., GERMONDD, M., LEYVRAZ, C. Effect of embryo culture media on birthweight and length in singleton term infants after IVF-ICSI. **Swiss Medical Weekly**, vol.144, artigo 14038, 2014.

XUE D., QING Y., YE Q., YUAN Z., JIA B. Endometrial Mesenchymal Stem Cells Isolated from Menstrual Blood by Adherence. **Stem Cells International**, vol. 2016, artigo 3573846, 8 pp, 2015.

YOUNIS, J.S., BEN-AMI, M., BEN-SHLOMO, I. The Bologna criteria for poor ovarian response: a contemporary critical appraisal. **Journal of Ovarian Research**, vol.8,

no. 76, 2015.

YU, C-H., ZHANG, R-P. , LI, J. e ZHOU-CUN A. A predictive model for high-quality blastocyst based on blastomere number, fragmentation, and symmetry. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, 2018.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F., ADAMSON, G.D., MOUZON J., Ishihara O., MANSOUR R. , NYGREN K., Sullivan E. , POEL, S. van der. **The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology**, pp 2684, 2009.

ANEXO A - Aprovações do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Hospital Universitário Clementino Fraga Filho
Faculdade de Medicina
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Coordenador:
Alice Helena Dutra Violante
Médico - Prof. Associado
Secretário:
Zumara Rodrigues da Silva
Professor
Membros Titulares:
Beatriz Maria Alasia de Heredia
Antropólogo – Prof. Associado
Carlos Henrique Fernandes Castelpoggi
Médico - Especialista
Elica Regina Ambrosio
Assistente Social - Mestre
Helena Warzynsky
Representante dos Usuários
Lucia da Conceição de Araújo Marques
Enfermeiro - Mestre
Marco Antonio Alves Brasil
Médico – Professor Adjunto
Mario Teixeira Antonio
Farmacêutico - Especialista
Nurimar Conceição Fernandes
Médico - Prof. Adjunto
Paulo Feijó Barroso
Médico - Prof. Assistente
Roberto Coury Pedrosa
Medico - Doutor
Membros Suplentes:
Anna Paola Trindade Rocha Picucci
Nutricionista - Professor Auxiliar
Beatriz Moritz Trope
Medico - Doutora
Carlos Alberto Guimarães
Medico - Prof. Associado
Cesônia de Assis Martinuzzo
Jornalismo
Lucia Helena Luiza Vieira Amim
Biólogo - Mestre
Maria da Conceição Lopes Buarque
Assistente Social
Mariangelica Oliveira da Silva
Enfermeiro
Michel Jean-Marie Thiollent
Sociólogo – Prof. Adjunto
Nathalie Henrique Silva Canedo
Médico - Professor Adjunto
Renan Moritz Varnier Rodrigues Almeida
Engenheiro - Professor Adjunto
Maria Bernadete Tavares Soares
Representante dos Usuários
Rui Haddad
Medico - Prof. Adjunto

CEP - MEMO – n.°408/09 Rio de Janeiro, 01 de Junho de 2009.

Da: Coordenadora do CEP

A (o): Sr. (a) Pesquisador (a): Profª. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Assunto: Parecer sobre projeto de pesquisa.

Sr. (a) Pesquisador (a),

Informo a V. S.a. que o CEP constituído nos Termos da Resolução n.° 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao protocolo de pesquisa páginas 001 a 043 e seu respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme abaixo discriminado:

Protocolo de Pesquisa: 056/09 - CEP

Título: "Sangue menstrual: uma fonte alternativa de célula-tronco."

Pesquisador (a) responsável: Profª. Regina Coeli dos Santos Goldenberg

Data de apreciação do parecer: 28/05/2009

Parecer: "APROVADO"

Informo ainda, que V. Sa. deverá apresentar relatório semestral, previsto para 28/11/2009, anual e/ou relatório final para este Comitê acompanhar o desenvolvimento do projeto. (item VII. 13.d., da Resolução n. ° 196/96 – CNS/MS).

Atenciosamente,

Profª. Alice Helena Dutra Violante
Coordenadora do CEP

HOSPITAL FEDERAL DE BONSUCESSO - RJ

Plataforma Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da segurança do uso de formulações celulares humanas em terapia celular para o tratamento de infarto agudo do miocárdio em modelo pré-clínico.

Pesquisador:
Área Temática:
Versão: 2
CAAE: 26046414.7.0000.5253
Instituição Proponente: Hospital Federal de Bonsucesso - RJ
Patrocinador Principal:

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 643.810
Data da Relatoria: 08/05/2014

Apresentação do Projeto:

As doenças cardiovasculares (DCV) representam um dos principais problemas de saúde no mundo, dada sua prevalência, incidência, mortalidade e impacto econômico.

As possibilidades atualmente disponíveis não são capazes de atender a todos os pacientes e uma das mais promissoras possibilidades de conduta terapêutica que atualmente está sob extensa investigação é a terapia celular.

O presente projeto se propõe a esclarecer os aspectos ainda desconhecidos no modelo animal de cardiopatia isquêmica em ratos infartados e poderá oferecer alternativas com formulações celulares humanas específicas a serem testadas. Os resultados deste projeto terão, portanto, implicações extremamente importantes para posterior aplicação clínica da terapia celular na cardiopatia isquêmica. Pesquisa experimental de característica laboratorial e estudo pré-clínico em modelo animal. Indivíduos de ambos os sexos, submetidos à cirurgia ortopédica, serão incluídos no estudo.Pacientes atendidos no Serviço de Ortopedia do Hospital Federal de Bonsucesso serão avaliados preliminarmente quanto aos critérios de inclusão e exclusão e terão amostras de sangue periférico coletadas anteriormente à cirurgia para a realização de testes sanguíneos.

Em caso de sorologias reagentes, os doadores serão notificados pela empresa e aconselhados a

procurar orientação médica. As amostras cujas sorologias sejam reagentes para HIV1/2, HCV ou HBsAg serão descartadas imediatamente após liberação do resultado sorológico.
Após a sedação do paciente para a cirurgia ortopédica principal, as células mononucleares da medula óssea (CMMO) serão obtidas por meio de aspirado de medula óssea (MO) na crista ilíaca. O aspirado será realizado em ambiente de centro cirúrgico e o volume de coleta será de 10 mL.
O estudo de segurança será conduzido em animais de laboratório, seguindo as normas padrão de experimentação animal. Trata-se de pesquisa experimental de característica laboratorial, no qual a segurança das formulações será testada por meio de injeções locais em modelos de toxicidade em ratos infartados.

Objetivo da Pesquisa:
Objetivo Geral: Este projeto tem como objetivo principal avaliar formulações celulares humanas de diferentes fontes e seus efeitos sobre o miocárdio infartado de ratos.

Objetivos específicos:
- Padronização das técnicas de coleta, transporte, acondicionamento, processamento e preparo das formulações celulares humanas;
- Avaliação da biodistribuição das células após a infusão em animais;
- Avaliação funcional do desempenho cardíaco nos animais com as respectivas formulações.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:
Não existe benefício imediato para os participantes e sim como um possível tratamento para a isquemia miocárdica.
Detectamos os riscos de uma punção de sangue periférico, assim como de uma punção de medula entre os participantes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:
Pesquisa relevante por propiciar tratamento promissor em humanos a ser realizado em etapa posterior.
Envolve os riscos de uma punção de medula óssea.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:
Os termos foram apresentados.

Recomendações:
Não se aplicam.

HOSPITAL FEDERAL DE BONSUCESSO - RJ

Plataforma Brasil

...tinuação do Parecer: 643.810

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após avaliação, o CEP-HFB considerou o projeto aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos a necessidade de que sejam encaminhados a este CEP relatórios semestrais com os dados parciais da pesquisa.

Solicitamos que, ao término da pesquisa, seja encaminhada a esta Comissão uma cópia do Relatório Final.

"Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar os relatórios parciais e final" (Item XI.2.d da Resolução 466/12)

...RIO DE JANEIRO, 12 de Maio de 2014

Assinador por:
CRISTINA CARVALHO VIANA DE ARAUJO
(Coordenador)

Endereço: Av. Londres, 616
Bairro: Bonsucesso **CEP:** 21.041-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3977-9833 **Fax:** (21)2561-2852 **E-mail:** cephgbrj@gmail.com

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

CEP-HUCFF/FM
Projeto n.º 056/09
Folha n.º 35
Ass. Sec.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

APROVADO - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - FM / HUCFF / UFRJ
REUNIÃO DE
28 MAIO 2009
SEC. CEP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto - Sangue menstrual: uma fonte alternativa de célula-tronco

Termo de esclarecimento:

Você está sendo convidada a participar de um projeto de pesquisa intitulado Sangue menstrual: uma fonte alternativa de célula-tronco cujo objetivo é identificar células-tronco humanas derivadas do sangue menstrual (CeSaM) visando sua futura utilização em ensaios pré-clínicos.

O procedimento fundamental para o início do projeto é coleta o sangue menstrual, na qual a sua participação será única e essencial. O sangue menstrual será coletado vinte quatro horas após o início do seu fluxo menstrual. A coleta será feita em um coletor de urina que contém 5 mL de uma solução salina sem cálcio e magnésio, suplementada com penicilina, estreptomicina e EDTA para evitar contaminação e formação de coágulos. Este será o único procedimento que você participará, a partir do sangue obtido poderemos identificar e caracterizar as células-tronco derivadas do sangue menstrual. Este procedimento não acarreta nenhum desconforto e risco de vida para você.

Não há benefício direto para você. Trata-se de um estudo experimental testando a hipótese de células com características tronco, com algum potencial terapêutico presentes no sangue menstrual, somente após a caracterização da célula a nível celular e molecular é que poderemos passar para os ensaios pré-clínicos e clínicos.

Em qualquer etapa do estudo, você poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável do estudo, a professora Regina Coeli dos Santos Goldenberg, que poderá ser encontrada através do telefone (21) 2562-6559 ou pelo email rcoeli@biof.ufrj.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Sala 01D-46 - 1º andar, telefone 2562-2480 – email : ccp@hucff.ufrj.br.

É garantido a liberdade de não querer participar do projeto de pesquisa ou de retirar o consentimento a qualquer momento, no caso da aceitação, sem qualquer prejuízo.

As informações obtidas serão analisadas em conjuntos com as informações obtidas de outras voluntárias, não sendo divulgada a identificação de nenhuma das voluntárias.

CEP-HUCFF/I
Projeto n.º 056/
Folha n.º 36

Não há despesas pessoais para você realizar a coleta do sangue menstrual, bem como, nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelo procedimento neste tudo (nexo casual comprovado), você tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

A pesquisadora responsável garante que utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Este material biológico obtido será utilizado somente para esta pesquisa, não sendo enviado ao exterior.

Termo de Consentimento

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações sobre o estudo citado acima que li ou que foram lidas para mim.

Eu discuti com a Dra Regina Coeli dos Santos Goldenberg, sobre minha decisão de participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento nesta Instituição.

_____

Nome do sujeito da pesquisa

Data:__ /__ /____

_____

Assinatura do sujeito da pesquisa

_____

Nome do Pesquisador

Data:__ /__ /____

_____

Assinatura do pesquisador

APROVADO - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
REUNIÃO DE
28 MAIO 2009
SMI / HUCFF / UFRJ

Anexo C – Aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais em Experimentação Científica

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 7 de fevereiro de 2018

Prezada Professora Tânia Maria Ruffoni Ortiga

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Cientifica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: **"Papel das Células Mesenquimais Derivadas do Sangue Menstrual no Desenvolvimento Embrionário em um Modelo Co-Cultivo.", protocolo n° 108/16**, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei n°11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto n°6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia **16/01/2018**.

Finalidade	**( ) Ensino (X) Pesquisa Científica**
Vigência do Projeto	**Até 07/03/2019**
Espécie/linhagem	***Mus muscullus/* Balb/c**
N° de animais	**36 animais**
Peso/idade	**15-20g / 4 semanas**
Sexo	**Machos e Fêmeas**
Origem	**Biotério Central de Camundongos da UFRJ - CCS - bloco E - subsolo - sala E18. - UFRJ**

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS