

# **Estudo Comparativo do Desenvolvimento de Embriões de Camundongo em Sistemas de Co-cultivo com Células Primárias e Permanentes como Modelo Experimental em Estudos de Fecundação *in vitro***

## *Comparative Study of Embryo Development in Different Co-culture Systems as an Experimental Model for *in vitro* Fertilization Studies*

**Magali D'Angelo, Andrea G Galuppo, Sonia H C Barra, Sabrina Amanda C M da Silva, Gisele M Melo, Nair M<sup>a</sup> C Zerio, Noeli Simone Viana**

Centro de Pesquisa & Desenvolvimento em Sanidade Animal-  
Laboratório de Biologia Celular – Instituto Biológico de São Paulo.

**Marco Roberto B Mello**

Departamento de Reprodução Animal – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia-USP.

### **Abstract**

*The aim of this study was evaluate the mouse embryo development in vitro. Swiss female mouse (6-8 weeks age) were superovulated (5IU of eCG and 5IU of hCG) and then matted. Eighteen hours late they were sacrificed for embryo retrieval. The embryos were washed in phosphate buffer sodium (PBS) with 10% of bovine calf serum (BCS). They were co-cultivated in 6 different kinds of somatic cell: primary culture was neuronium and hepatocyt (rat fetus) and bovine oviduct epithelial cell (BOEC); established cell were MDBK (bovine kidney), VERO (green mouse kidney) and RK-13 (rabbit kidney). The cell culture was kept at 5% CO<sub>2</sub>, 37°C and 90 humidity*

*and evaluations were performed after 24, 48 and 72 hours. The culture media was tissue culture media 199 (TCM199) supplemented with 10% BCS and 0,22% sodium piruvate. In part*

Correspondência para:

Dra Magali D'Angelo  
Instituto Biológico de São Paulo  
Centro de P&D em Sanidade Animal  
Laboratório de Biologia Celular  
Av Conselheiro Rodrigues Alves, 1.252 – Vila Mariana  
CEP: 04014-002 – São Paulo-SP  
Tel.: (11) 5087-1713 – Fax: (11) 5087-1719  
E-mail: andrea\_giannotti@hotmail.com

*of the experiment it was added at the culture media epidermal growth factor (EGF). The data were analyzed according to number of embryos, which were able to cross the 2-cell blockage after 72h. The control group was not able to cross the blockage. The experimental group was separated according to co-culture type and presence or absence of EGF. The data showed that BOEC is the best co-culture system without EGF, with 33% of the embryos crossing the blockage. About the others co-culture system the best one was with rat hepatocyt, showing 22% of the embryos crossing the blockage without EGF and 15% with it. The co-culture system with established cell is justified by the fact that these cell promote a better sanitary support for embryos. However primary cell seems to preserve essential embryotrophic characteristics, allowing a better embryo development in vitro. These studies are also important when we consider the need of an in vitro model to help in the evaluation of embryo/somatic cell or embryo/pathogens interactions.*

---

Key words: *co-culture, mouse embryo, experimental model, IVF.*

---

## Introdução

Diferentes sistemas de cultivo *in vitro* vêm sendo testados a fim de se obter embriões de qualidade para a transferência, tanto em medicina veterinária quanto na humana, para que maiores taxas de gestação e implantação sejam alcançadas. Uma estratégia muito estudada é o sistema de co-cultivo que pode ser montado com diferentes tipos de células somáticas, provenientes tanto de culturas primárias, como as células epiteliais de oviduto bovino (BOEC), quanto de linhagens estabelecidas, como as células VERO (rim de macaco verde), sempre com a intenção de melhorar o desenvolvimento embrionário *in vitro* (Bo Sun Joo *et al.* 2001; Wiener *et al.*, 1998; Fukaya *et al.*, 1996; Spandorfer *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1999). Existem vários relatos demonstrando os efeitos benéficos do co-cultivo no desenvolvimento embrionário, como por exemplo, a melhora na qualidade morfológica dos embriões e o aumento da taxa de blastulação (Wiener *et al.*, 1998; Freeman *et al.*, 1995; Rief *et al.*, 2002). Entretanto, estudos ainda devem ser feitos para a elucidação desses mecanismos embriotróficos. Atualmente, são considerados dois tipos de efeito sobre o embrião; o primeiro seria através da remoção de componentes deletérios ou oxidativos do meio de cultura. É sabido que a hipoxantina e espécies livres de oxigênio reativo são prejudiciais ao embrião, sendo então removidos do meio de cultura pelas células do co-cultivo (Bo Sun Joo *et al.*, 2001). O segundo seria em relação à liberação pelas células de substâncias embriotróficas no meio, como por exemplo, fatores de crescimento, citocinas e outras proteínas (Bo Sun Joo *et al.*, 2001).

Segundo Fukaya *et al.* (1996) não devemos descartar também a possibilidade do contato das células da monocamada com os embriões para benefício de seu desenvolvimento. Apesar de todas essas informações a respeito dos sistemas de co-cultivo, ainda não estão totalmente claras as variáveis presentes no seu funcionamento, sendo importante a realização contínua de estudos para a elucidação dos mecanismos envolvidos nesse tipo de cultura, para a produção de embriões morfológica e fisiologicamente superiores.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de diferentes culturas de células somáticas (permanentes e primárias) no desenvolvimento *in vitro* de zigotos de camundongo, como forma de se estabelecer um sistema modelo de co-cultura para futuros estudos sobre a relação dos embriões com os diferentes tipos celulares.

## Material e Métodos

### *Animais*

Camundongos fêmeas (linhagem Swiss) com seis a oito semanas de idade foram superovuladas com 5UI de eCG (gonadotrofina coriônica equina) via intraperitoneal e, após 46-48 horas foi ministrado 5UI de hCG (gonadotrofina coriônica humana). Após a aplicação do hCG, as fêmeas foram colocadas com machos inteiros da mesma linhagem e idade para acasalamento. Dezoito horas após a aplicação do hCG, as fêmeas foram sacrificadas para coleta dos zigotos.

### *Culturas Primárias*

Cultura de células de hepatócito e neurônio de fetos de rato.

Foram utilizadas ratas (Wistar) prenhes de 3 a 4 meses de idade. Entre 15 e 17 dias de gestação as fêmeas foram sacrificadas e os fetos foram separados em placas de petri estéreis, removidos os anexos embrionários e decapitados. A cabeça e o corpo do animal foram colocados em placas de petri diferentes, separando-se respectivamente, o cérebro e o fígado, os quais foram lavados em meio Dulbecco modificado (DMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB). Tanto o cérebro quanto o fígado foram picotados com tesoura de ponta fina estéril, em fragmentos de cerca de 1 a 2mm. Esses foram colocados em tubos de centrifuga, com capacidade para 15ml; para decantação por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e então 5ml de solução de tripsina foram adicionados aos fragmentos. Os tubos foram mantidos em banho-maria à 37°C por 20 minutos, sob agitação. Após nova decantação o sobrenadante foi desprezado e a ação da tripsina foi neutralizada com DMEM acrescido

de 20% SFB. O material foi centrifugado por 7 minutos a 1.000rpm e as células superficiais do pellet foram ressuspensas com 2ml de DMEM acrescido de 10% SFB. Essa suspensão final foi distribuída em frascos mantidos em estufa de 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C e 90% de umidade.

#### *Cultura de Células do Oviduto Bovino*

As células para cultura primária do oviduto bovino foram obtidas de vacas e novilhas provenientes do abatedouro Mantiqueira, São José dos Campos-SP. Aproximadamente entre 15 e 20 minutos após abate do animal, no momento da evisceração, os ovidutos foram coletados de ovários que apresentavam sinais de ovulação recente (com presença de corpo lúteo). Esses ovidutos foram transportados em frascos contendo solução salina tamponada (PBS) estéril, acrescida de antibiótico, pH 7,2 à temperatura de 33°C. Os ovidutos foram dissecados com auxílio de pinça e tesoura estéreis e colocados em uma placa de petri com PBS. Com uma lâmina de vidro fixava-se uma extremidade da tuba (fímbrias) e com uma segunda lâmina comprimia-se a tuba no sentido fímbria/istmo para a obtenção das células epiteliais. O material coletado foi lavado com solução de PBS por decantação (20 minutos) três vezes seguidas. As células foram então mantidas em garrafas de cultivo de 25cm<sup>3</sup> com meio TCM199 (Tissue Culture Medium-199) suplementado com 10% SFB, 0,1% de antibiótico e 0,22% de solução de piruvato. A cultura foi mantida em estufa de CO<sub>2</sub> à 5%, à 37°C e 90% de umidade (Gonçalves, 1998).

#### *Linhagens Estabelecidas de Rim Bovino (MDBK), Rim Leporino (RK-13) e Rim de Macaco Verde (VERO)*

As linhagens estabelecidas foram mantidas em meio Eagle Minimum Essential Medium (MEM) suplementado com 10%SFB, bicarbonato e 100µg/ml de gentamicina, em estufa de CO<sub>2</sub> à 5%, 37°C e 95% de umidade. Procedência das células MDBK: Laboratório de Vírus de Bovídeos do Centro de Pesquisa & Desenvolvimento em Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo. Procedência das células RK-13 e VERO: Laboratório de Biologia Celular do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal do Instituto Biológico de São Paulo.

#### *Coleta dos Zigotos*

As fêmeas foram sacrificadas pelo deslocamento da cérebrospinal, e após rigorosa assepsia os ovidutos foram expostos, removidos e colocados individualmente em gotas de PBS com 10% de SFB. Os zigotos foram coletados, lavados em solução

de PBS e mantidos em co-cultura de acordo com os grupos descritos a seguir.

#### *Sistemas de Co-cultivo*

As monocamadas de células foram preparadas 24 horas antes da coleta dos zigotos. Como meio de manutenção, para todas as culturas, foi utilizado o TCM 199 acrescido de 10% SFB e 0,22% de piruvato de sódio. Em parte do experimento foi acrescido ao meio, fator de crescimento (epidermal growth factor-EGF) (**Tabela 1**). Foram utilizados seis tipos de células somáticas: células provenientes de cultura primária: neurônio e hepatócito de feto de rato e BOEC; células provenientes de linhagens permanentes: MDBK, RK-13 e VERO. Os co-cultivos foram mantidos em estufa à 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C e 90% de umidade. O desenvolvimento embrionário foi avaliado após 24, 48 e 72 horas de cultivo. A análise dos resultados foi feita em relação ao número de embriões que ultrapassaram o bloqueio de duas para quatro células após 72 horas de cultivo.

**Tabela 1**  
**Grupos Experimentais dos Sistemas de Co-cultivo Com e Sem EGF**

Sistemas de co-cultivo	
Com EGF	Neurônio, Hepatócito, BOEC, MDBK, RK-13, VERO
Sem EGF	Neurônio, Hepatócito, BOEC, MDBK, RK-13, VERO

#### **Resultados**

Os embriões dos grupos controle não foram capazes de ultrapassar o bloqueio de duas células. A análise dos dados mostrou que para embriões de camundongo o melhor sistema de co-cultivo na ausência de EGF foi com as células epiteliais de oviduto bovino (BOEC) com 33% dos embriões ultrapassando o bloqueio. Em relação aos demais sistemas, o que apresentou melhores resultados para os embriões foram as células de hepatócito de rato, tanto na presença quanto na ausência de EGF no meio de cultura, representando respectivamente 22% e 15%. Os dados estão representados na **Tabela 2**.

**Tabela 2**  
**Porcentagem de Embriões que Ultrapassaram o Bloqueio**  
**de 2 Células em Diferentes Sistemas de Co-cultivo**

Grupos	Total de Embriões		Embriões que passaram o bloqueio	
	Com EGF	Sem EGF	Com EGF	Sem EGF
Neurônio	74	20	8 (11%)	1 (5%)
Hepatócito	45	73	10 (22%)*	11 (15%)
MDBK	42	44	6 (14%)	3 (7%)
RK-13	74	18	10 (13%)	1 (5%)
VERO	74	56	9 (12%)	1 (2%)
BOEC	0	58	0	19 (33%)*
Controle somente com meio	37	31	0	0

\* melhores resultados.

## Discussão

Na maioria das espécies de mamíferos o desenvolvimento embrionário *in vitro* sofre um bloqueio, impedindo que os embriões alcancem o estágio de blastocisto. No caso de camundongos e hamsters, o bloqueio normalmente acontece no estágio de 2 células, já em humanos e bovinos ele ocorre no estágio de 4 a 8 células. Aparentemente, esse bloqueio é proveniente de condições sub-ótimas de cultivo e ocorre no momento da ativação do genoma (Bo Sun Joo *et al.*, 2001). Vários pesquisadores têm trabalhado com sistemas de co-cultivo na tentativa de melhorar a qualidade do microambiente onde o embrião se desenvolve (Carvalho W *et al.*, 2000). Muitos tipos celulares vêm sendo utilizados nesses sistemas, mas não se sabe ainda se algum tipo em particular é mais efetivo que outro (Spandorfer *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 1999; Freeman *et al.*, 1995).

Nossos resultados mostraram que o melhor sistema de co-cultivo (na ausência de EGF) para embriões de camundongo foi com BOEC, com 33% dos embriões ultrapassando o bloqueio de 2 células, confirmando os resultados encontrados por Eyestone & First (1989). Esses autores demonstraram que a cultura primária de células epiteliais de oviduto bovino facilita o desenvolvimento de embriões bovinos *in vitro* até o estágio de blastocisto. Resultados semelhantes foram obtidos por Marquant-Leguienne & Humblot (1998) onde o co-cultivo com BOEC facilitou o desenvolvimento de embriões bovinos produzidos *in vitro*, evitando o bloqueio no estágio de 8 células e permitindo que embriões transferidos em vacas receptoras alcançassem os estágios iniciais da gestação (Marquant-Leguienne & Humblot, 1998).

Foram detectadas no meio de cultura de células da granulosa bovinas e células VERO, duas substâncias embriotróficas, uma entre 10 e 30 kd e a outra maior que 30 kd (Bo Sun Joo *et al.*, 2001). Entretanto, ainda não se tem nenhuma evidência concreta da influência desses fatores embriotróficos sobre a cultura de embriões, porém sua presença fornece informações sobre o papel benéfico das condições de co-cultivo para os embriões (Bo Sun Joo *et al.*, 2001). De acordo com Bavister (1992), os sistemas de co-cultivo funcionariam não como estimulantes do desenvolvimento embrionário, mas sim melhorando as condições da cultura através da remoção de componentes deletérios que seriam liberados pelos embriões durante seu desenvolvimento (Bavister, 1992).

Na realidade, muitos estudos relacionados aos efeitos do co-cultivo em embriões de mamíferos, incluindo células humanas, têm demonstrado que esses sistemas melhoram a qualidade embrionária, a taxa de blastulação e as taxas de implantação e gestação (Bo Sun Joo *et al.*, 2001). De acordo com nossos resultados, as culturas primárias parecem preservar características embriotróficas essenciais, permitindo um desenvolvimento embrionário mais eficiente *in vitro*. Esses resultados são também relevantes quando se considera a necessidade de um modelo *in vitro*, de fácil acesso e controle, para a avaliação de interações de células somáticas com embriões.

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de culturas primárias e permanentes no desenvolvimento *in vitro* de zigotos murinos. Fêmeas Swiss (6 a 8 semanas de idade)

foram superovuladas com 5UI de eCG e 5UI de hCG e acasaladas. Dezoito horas após o hCG, foram sacrificadas para coleta dos zigotos, que foram lavados em solução salina tamponada com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB). Foram então co-cultivados em 6 tipos de células somáticas: culturas primárias-neurônio e hepatócito (feto de rato) e BOEC (células epiteliais de oviduto bovino); linhagens estabelecidas-MDBK (rim bovino), RK-13 (rim leporino) e VERO (rim de macaco verde). As culturas de células foram mantidas à 5% de CO<sub>2</sub>, 37°C e 90% de umidade e as avaliações foram feitas após 24, 48 e 72h. Foi utilizado o meio TCM 199 com 10% SFB e 0,22% de piruvato de sódio. O fator de crescimento (EGF) foi acrescido em parte do experimento. A análise dos resultados foi feita em relação ao número de embriões que ultrapassaram o bloqueio de 2 células após 72h de cultivo. Os grupos controle não foram capazes de ultrapassar o bloqueio. Os grupos experimentais foram divididos de acordo com o tipo de célula usada no co-cultivo e em relação à presença ou não de EGF no meio de cultura. Os dados mostraram que BOEC foi o melhor sistema de co-cultivo na ausência de EGF, com 33% dos embriões ultrapassando o bloqueio. Em relação aos demais, o que apresentou melhores resultados foi com as células de hepatócito de rato na presença (22%) e ausência (15%) de EGF. O co-cultivo com células permanentes é justificado pelo fato de que linhagens de células estabelecidas garantem um suporte celular de melhor qualidade sanitária. Entretanto, as culturas primárias parecem preservar características embriotróficas essenciais, permitindo melhor desenvolvimento embrionário *in vitro*. Esses estudos são também relevantes quando se considera a necessidade de um modelo *in vitro* de fácil acesso e controle para avaliação de interações de células somáticas/zigoto e patógenos/embriões provenientes de FIV (Fecundação *In Vitro*).

---

*Unitermos: co-cultivo, embriões de camundongo, modelo experimental, FIV.*

---

## Referências

1. Bavister BD. Co-culture for embryo development: is really necessary? Human Reprod 7: 1339-41, 1992.
2. Bo Sun Joo; Mi Kyung Kim, Yong Jin Na *et al.* The mechanism of action of co-culture on embryo development in the mouse model: direct embryo-to-cell contact and the removal of deleterious components. Fertil Steril, 75(1): 193-199, 2001.
3. Eyestone WH & First NL. Co-culture of early cattle embryos to the blastocyst stage with oviductal tissue or in conditioned medium. J. Reprod. Fert. 85: 715-720, 1989.
4. Freeman M, Whitworth M, Hill G. Granulosa cell co-culture enhances human embryo development and pregnancy rate following in vitro fertilization. Human Reprod 10:408-414, 1995.
5. Fukaya T, Chida S, Murakami T, Yajima A. Is direct cell-to-cell contact handed to improve embryonic development in co-culture? Tohoku Exp. Med. 180:225-232, 1996.
6. Gonçalves RF. Estudo morfológico de células epiteliais da tuba uterina de bovinos *in vitro*. Dissertação apresentada para obtenção de título de Mestre, junto à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 1998.
7. Lee YL; Chan STH, Yeung WSB,. VERO cells but not oviductal cells affect mouse embryo development partly by changing the concentration of nutrients in the culture medium. Abstracts of the 15<sup>th</sup> Annual Meeting of the ESHRE, R-134, Tours-France, 1999.
8. Marquant-Leguienne B & Humblot P. Practical measures to improve in vitro blastocyst production in the bovine. Theriogenology 49: 3-11, 1998.
9. Rief S, Sinowatz F, Stojkovic M, Einspainer R, Wolf E and Prella K. Effects of a novel co-culture system on development, metabolism and gene expression of bovine embryos produced in vitro. Reproduction 124(4): 543-56, 2002.
10. Spandorfer SD, Barnat L, Navarro J, Burmeister L, Veeck L, Clarke R, Liu HC and Rosenwaks Z. Autologous endometrial coculture in patients with a previous history of poor quality embryos. J. Assist. Reprod. Genet. 19(7): 309-12, 2002.
11. Wiener KE, Cohen J, Tucker MJ, Gode KRA. The application of co-culture in assisted reproduction: 10 years of experience with human embryos. Human Reprod. 13(suppl4): 226-238, 1998.

Agradecimentos: EMBRIOCARE/CULTILAB.