

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

AMANDA NESPOLO SILVA

**Interação materno-embrionária *in vitro* mediada por vesículas
extracelulares em bovinos**

Área de concentração: Anatomia dos animais domésticos e silvestres

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Henrique Camara De Bem

São Paulo

2023

AMANDA NESPOLO SILVA

Interação materno-embrionária *in vitro* mediada por vesículas extracelulares em bovinos

VERSÃO CORRIGIDA

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestre (FMVZ-USP), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Ciências**.

Departamento: Cirurgia Veterinária

Área de concentração: Anatomia dos animais domésticos e silvestres

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

Coorientador: Prof. Dr. Tiago Henrique Camara De Bem

São Paulo

2023

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SILVA, Amanda Nespolo

Título: Interação materno-embrionária *in vitro* mediada por vesículas extracelulares em bovinos

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Área de concentração em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestre (FMVZ-USP), como requisito parcial para a obtenção do título de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em de 13/04/2023:

Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles, Dr. (USP)
(Presidente/Orientador)

Prof. Dr. Mário Binelli

Prof. Dr. Juliano Coelho da Silveira (USP)

São Paulo

2023

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

4307 FMVZ	Silva, Amanda Nespolo Interação materno-embriônica <i>in vitro</i> mediada por vesículas extracelulares em bovinos / Amanda Nespolo Silva. – 2023. 80 f. : il.
	Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2023.
	Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
	Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.
	Orientador: Prof. Dr. Flavio Vieira Meirelles. Coorientador: Prof. Dr. Tiago Henrique Camara De Bem.
	1. Comunicação materno-embriônica. 2. Vesículas extracelulares. 3. Epitelial. 4. Estromal. 5. Trofotoderma. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Camila Molgara Gamba, CRB 7070-8, da FMVZ/USP.



Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Flávio Vieira Meirelles
Área: Anatomia Dos Animais Domésticos E Silvestres
Equipe envolvida: Amanda Nespolo Silva - (executante);

Título da proposta: "INTERAÇÃO MATERNO-EMBRIONÁRIA IN VITRO MEDIADA POR VESÍCULAS EXTRACELULARES EM BOVINOS."

Parecer Consubstanciado da CEUA FMVZ

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo, na reunião de 04/02/2021, **ANALISOU** e **APROVOU** a proposta acima referenciada. A partir desta data, é dever do pesquisador:

1. Comunicar toda e qualquer alteração.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da proposta.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.
4. **Relatórios parciais** de andamento deverão ser enviados **anualmente** à CEUA até a conclusão da proposta.

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

À Deus e Nossa Senhora. Aos meus
pais, Solange e Fernando por sempre
sonharem o meu sonho.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, irmão, avó e tios, por todo amor, compreensão, palavras de carinho e por entenderem meus momentos ausentes durante este período. Espero um dia recompensa-los com orgulho do meu trabalho.

Aos meus amigos e meu namorado, que mesmo de longe me apoiam, acreditam em mim e foram minha saudade diária durante o mestrado.

Os meus novos amigos que tornaram o mestrado muito mais leve e que me ensinaram muito, dentro e fora do laboratório: Thais, João Paixão, Dewilson, Juliano, Paola, Giu, Gislaine e Kaiana. Em especial duas pessoas que me inspiram profissionalmente e por serem exemplo de conduta Dra. Alessandra e Dra. Maíra.

Aos professores Cláudia, Felipe, Fabiana e Juliano e à Cibele por toda organização, planejamento e coordenação do laboratório e dos projetos.

Ao meu orientador Prof. Flávio e meu coorientador Dr. Tiago, por todo suporte, dedicação, ensinamento, paciência, confiança, oportunidades e palavras de incentivo. Gostaria de deixar claro que minha admiração por vocês, não se limita somente no profissional, mas sim como pessoas.

À toda equipe de laboratório do LMMD, que nunca mediram esforços para auxiliar no projeto seja de forma prática ou com críticas e sugestões.

À FZEA/USP e FMVZ/USP por toda estrutura para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento à pesquisa: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) e FAPESP (2021/02458-0) pela bolsa e financiamento do projeto.

Muito obrigada a todos que participaram da realização deste trabalho de mestrado de forma direta ou indireta.

RESUMO

SILVA, A.N. **Interação materno-embrionária *in vitro* mediada por vesículas extracelulares em bovinos.** 2023. 80p Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023

Em ruminantes, o reconhecimento materno da prenhez (MRP) envolve a produção de interferon tau (IFNT) pelas células do trofotoderma (TE) do embrião para prevenir a luteólise. Apesar da sinalização IFNT ser caracterizada, a produção e liberação de vesículas extracelulares (VEs) surgiu como um potencial mecanismo de comunicação celular entre a mãe e o embrião durante a MRP. A hipótese deste projeto é que as células do endométrio e do TE cultivadas *in vitro* podem produzir e liberar VEs, que podem ser internalizadas e modulam o transcriptoma nas células-alvo. Para testar essa hipótese, geramos culturas de células endometriais (origem epitelial e estromal) e de células do TE de blastocistos FIV e isolamos as VEs dos meios de cultura. As linhagens de células epiteliais e estromais (n = 5) foram isoladas, mantidas até a 4ª passagem e, posteriormente, caracterizadas por imunofluorescência (anti-citoqueratina, células epiteliais e anti-vimentina, células estromais). As células do TE dos embriões FIV foram cultivadas até a 2ª passagem e caracterizada por imunofluorescência (anti-CDX2). As VEs isolados foram avaliadas quanto ao tamanho e a concentração de partículas usando Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Em relação a caracterização das células endometriais observamos que apenas células epiteliais foram positivas para citoqueratina e as células estromais foram positivas para vimentina, como esperado. As células do TE foram positivas para CDX2. As VEs mostraram um tamanho médio de $131,92 \pm 5,52$, $153,46 \pm 7$ e $143,66 \pm 4,60$ e concentração $6,54E+08 \pm 4,57E+07$, $8,15E+08 \pm 4,59E+07$ e $2,56E+11 \pm 1,61E+10$ partículas/mL, para células epiteliais, estromais e do TE, respectivamente. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos estudados. A caracterização das VEs por *Western blotting* confirmou a presença de ALIX e a ausência da proteína GRP78 nas VEs. Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) mostrou que as VEs possuem morfologia e tamanho esperado ($< 150\text{nm}$). Para simular o “*crosstalk*” materno-embrionário *in vitro* e investigar como as VEs modulam os transcritos nas células alvo, realizamos o tratamento das células endometriais com VEs do TE e vice e versa, o tratamento das células da TE com VEs das células endometriais. Após 6 horas de tratamento, o RNAseq revelou que as VEs da linhagem do TE dos embriões alteraram de maneira mais ampla o perfil transcricional das células estromais em comparação com as células epiteliais. Alguns dos genes significativamente alterados ($P < 0,05$) fazem parte de vias de sinalização importantes como a da via PI3K/Akt, que é fundamental durante o período do desenvolvimento pré-implantação, a via ECM-receptor interaction, que está diretamente relacionada com processos do contato inicial do embrião com o endométrio materno, a via de sinalização Cytokine-cytokine, que é crucial durante as respostas imunológicas e inflamatórias, dentre outras. Com os resultados gerados neste estudo, foi possível gerar pela primeira vez o modelo *in vitro* que mimetiza o microambiente de comunicação materno embrionária inicial com a troca de VEs entre células endometriais e embrionárias. Esperamos utilizar o conhecimento aqui gerado, para esclarecer os efeitos específicos das VEs, tornando o ambiente da fertilização *in vitro* mais próximo ambiente *in vivo*.

Palavra-chave:Materno-embrionária. Vesículas extracelulares. Epitelial. Estromal. Trofotoderma.

ABSTRACT

SILVA, A.N. ***In vitro* maternal-embryonic interaction mediated by Extracellular vesicles in cattle.** 2023. 80p Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023

In ruminants, maternal recognition of pregnancy (MRP) involves the production of interferon tau (IFNT) by the trophectoderm (TE) cells of the embryo to prevent luteolysis. Although IFNT signaling is well characterized, the production and release of extracellular vesicles (Evs) has emerged as a potential mechanism of cellular communication between mother and embryo during MRP. Thus, the hypothesis of this project is that endometrial and TE cells cultivated *in vitro* can produce and release Evs, which can be internalized and modulate the transcriptome in the target cells. To test this hypothesis, we generated cultures of endometrial cells (epithelial and stromal) and TE cells from IVF blastocysts. After, Evs were isolated from the culture media. The epithelial and stromal cell lineages (n = 5) were maintained until the 4th passage and were characterized by immunofluorescence (anti-cytokeratin, epithelial cells and anti-vimentin, stromal cells). TE cells from IVF embryos were cultured until the 2nd passage and characterized by immunofluorescence (anti-CDX2). Evs were evaluated for particle size and concentration using Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). Regarding the characterization of endometrial cells, only epithelial cells were positive for cytokeratin and stromal cells were positive for vimentin, as expected. TE cells were positive for CDX2. The Evs showed average size of 131.92 ± 5.52 , 153.46 ± 7 and $143.66\text{nm} \pm 4.60$ and concentration $6.54\text{E}+08 \pm 4.57\text{E}+07$, $8.15\text{E}+08 \pm 4$, $59\text{E}+07$ and $2.56\text{E}+11 \pm 1.61\text{E}+10$ particles/mL, for epithelial, stromal and TE cells, respectively. There was no significant difference ($P > 0.05$) between the groups. The characterization of the Evs by Western blotting confirmed the presence of ALIX and the absence of the GRP78 protein in the Evs. Furthermore, transmission electron microscopy (TEM) showed that Evs have the expected morphology and size ($< 150\text{nm}$). To simulate maternal-embryonic crosstalk *in vitro* and investigate how Evs modulate transcripts in target cells, we performed the treatment of endometrial cells with Evs from TE and vice versa, the treatment of TE cells with Evs from endometrial cells. After 6 hours of treatment, RNAseq revealed that Evs from the TE lineage more broadly altered the transcriptional profile of stromal cells compared to epithelial cells. Some of the significantly altered genes ($P < 0.05$) are related with important signaling pathways such as PI3K/Akt pathway, fundamental during the pre-implantation development period, ECM-receptor interaction pathway, directly related with the early contact of the embryo with endometrium, Cytokine-cytokine signaling pathway, crucial during immunological and inflammatory responses, among others. Herein, we generate for the first time, an *in vitro* model that mimics the microenvironment of early embryonic maternal interaction by the exchange of Evs between endometrial and embryonic cells. The knowledge generated here will clarify specific effects of Evs, providing the IVF environment more similar to the *in vivo*.

Keywords: maternal-embryonic. Extracellular vesicles. Epithelial. Stromal. Trophectoderm.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenvolvimento do embrião bovino	18
Figura 2. Sinalização parácrina do IFNT com o endométrio no período de reconhecimento materno da gestação.....	20
Figura 3. Esquema de como diferentes tipos de vesículas extracelulares são secretados	24
Figura 4. Esquema ilustrativo das etapas de coleta e caracterização das VEs produzidas pelos blastocistos FIV e células endometriais <i>in vitro</i>	28
Figura 5. Imunofluorescência das células estromais endometriais cultivadas <i>in vitro</i>	40
Figura 6. Imunofluorescência das células epiteliais endometriais cultivadas <i>in vitro</i>	41
Figura 7. Estabelecimento da linhagem do trofotoderma de blastocistos	44
Figura 8. Estabelecimento da linhagem do trofotoderma de blastocisto.	45
Figura 9. Linhagens de células do trofotoderma após repique celular	46
Figura 10. Imunofluorescência das células do trofotoderma cultivadas <i>in vitro</i>	47
Figura 11. Cultivo de células do trofotoderma derivadas de embriões produzidos <i>in vitro</i>	48
Figura 12. Gráfico de contagem de células do trofotoderma.....	49
Figura 13. Gráficos representando concentração e tamanho das partículas analisadas no NTA.	50
Figura 14. Gráficos representando concentração e tamanho das partículas analisadas no NTA.	51
Figura 15. Caracterização das vesículas extracelulares produzidas pelas células cultivadas <i>in vitro</i> por Western blotting.	52
Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas extracelulares produzidas por células endometriais e das células do trofotoderma.....	52
Figura 17. Imunofluorescência das células endometriais (epiteliais) cultivadas <i>in vitro</i>	53
Figura 18. Imunofluorescência das células endometriais (estromais) cultivadas <i>in vitro</i>	54
Figura 19. Imunofluorescência das células do trofotoderma de embriões FIV cultivadas <i>in vitro</i>	55
Figura 20. Análise de componentes principais (PCA)	56
Figura 21. Heatmap.....	56
Figura 22. Análise de componente principal (PCA).....	57
Figura 23. Gráfico vulcão exibindo os resultados de genes diferencialmente expressos (DEG)	58
Figura 24. Análise de componente principal (PCA).....	59
Figura 25. Heatmap.....	60
Figura 26. Representação esquemática das vias de sinalização	61
Figura 27. Networking de interação entre as vias e os genes.	62
Figura 28. Análise de componente principal (PCA).....	63
Figura 29. Representação esquemática das vias de sinalização	64
Figura 30. Networking de interação entre as vias e os genes.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Imunofluorescência das células epiteliais endometriais cultivadas <i>in vitro</i>	43
---	----

Sumário

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1 INTRODUÇÃO.....	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Ambiente uterino.....	16
2.2 Desenvolvimento embrionário	17
2.3 Estabelecimento da gestação em bovinos	19
2.3.1 Interferon-Tau (IFNT).....	21
2.3.2 Função da progesterona (P4) no ambiente materno embrionário	22
2.4 Vesículas extracelulares (VEs)	23
3 HIPÓTESE.....	26
4 OBJETIVOS.....	26
5 DESENHO EXPERIMENTAL.....	28
6 MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
6.1 Cultivo primário e isolamento das células endometriais	29
6.2 Caracterização por imunofluorescência das células endometriais.....	29
6.3 Isolamento das VEs produzidas por células endometriais no meio de cultivo	30
6.4 Obtenção dos ovários, seleção dos oócitos e maturação <i>in vitro</i> (MIV).....	31
6.5 Fecundação <i>in vitro</i> (FIV).....	31
6.6 Cultivo <i>in vitro</i> (FIV).....	32
6.7 Isolamento das células do trofotoderma dos blastocistos FIV	32
6.8 Caracterização por imunofluorescência das células do trofotoderma	33
6.9 Isolamento das VEs produzidas por células do trofotoderma no meio de cultivo	33
6.10 Quantificação e caracterização das VEs produzidas pelas células endometriais e do trofotoderma	34
6.11 Absorção de VEs do trofotoderma pelas células endometriais e absorção das VEs das células endometriais pelo trofotoderma.	35
6.12 Tratamento das células endometriais com VEs produzidas por células do trofotoderma de embriões FIV e tratamento das células do trofotoderma com VEs das células endometriais.....	37
6.13 Preparação e sequenciamento da biblioteca de RNA.....	37
6.14 Quantificação de transcritos globais e comparação entre amostras de grupos experimentais.....	38
6.15 Análise estatística.....	39

7	RESULTADOS	39
7.1.1	Caracterização das células endometriais (estromais e epiteliais) por imunofluorescência	39
7.1.2	Produção <i>in vitro</i> de embrião para isolamento das células do trofotoderma	42
7.1.3	Caracterização morfológica das células do trofotoderma	43
7.1.4	Caracterização das células do trofotoderma por imunofluorescência.....	46
7.1.5	Contagem de núcleo das células do trofotoderma	47
7.2	Isolamento e caracterização das Vesículas Extracelulares do meio de cultivo de células endometriais e do trofotoderma	49
7.2.1	Caracterização das VEs isoladas do meio de cultivo de células endometriais por NanoSight.....	49
7.2.2	Caracterização das VEs isoladas do meio de cultivo de células do trofotoderma por NanoSight.....	50
7.2.3	Caracterização das VEs isoladas do meio de cultivo de células endometriais e células do trofotoderma por <i>Western blotting</i>	51
7.2.4	Caracterização das VEs isoladas do meio de cultivo de células endometriais e do trofotoderma por microscopia eletrônica de transmissão.....	52
7.3	Células endometriais (epiteliais e estromais) absorvem as VEs produzidas pelas células da trofotoderma	53
7.3.1	Células do trofotoderma de blastocistos absorvem as VEs produzidas pelas células da epiteliais.....	54
7.3.2	Perfil de RNAm de células endometriais (epiteliais e estromais) e células do trofotoderma após suplementação com vesículas extracelulares.....	55
8	DISCUSSÃO	65
9	CONCLUSÃO	75
10	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	77

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma biotécnica que possui grande relevância e é amplamente utilizada em espécies domésticas para aumento da produtividade dos rebanhos. Apesar da sua relevância, a PIVE, assim como outras biotecnologias da reprodução, ainda possui algumas limitações, como por exemplo, perdas gestacionais, que ocorrem com a maior frequência durante o período embrionário inicial (até aos 42 dias da gestação), comparado ao período fetal (42 a 290 dias) ou neonatal (até 28 dias após o parto) (THATCHER et al., 2001; FARIN, et al., 2004).

Estas perdas iniciais de gestação representam em torno de 40% de todas as perdas embrionárias, período considerado crítico para a manutenção da gestação e na maioria dos casos estão associadas a falhas no reconhecimento materno da gestação entre 14^o e 16^o dias (FARIN, 2004). Durante esta fase inicial é fundamental uma comunicação entre o embrião e o útero materno para o correto desenvolvimento, e nutrição do embrião. A otimização do reconhecimento materno, implica no aumento das taxas de prenhez por permitir mais tempo e/ou melhor comunicação nesse período, para o concepto se desenvolver e tornar eficiente sua sinalização, prevenindo a luteólise e evitando a mortalidade embrionária precoce.

O estabelecimento da gestação em ruminantes inicia-se com a presença do blastocisto no útero (SPENCER et al., 2008; ROBERTS., 2017). A partir desse momento, o blastocisto evolui da forma esférica para tubular, alonga-se, formando as membranas embrionárias antes da implantação (SPENCER et al., 2004). Este desenvolvimento coincide com o reconhecimento materno da gestação, quando o concepto sinaliza sua presença para a mãe (SPENCER e BAZER., 1996). A sinalização do embrião ocorre principalmente através da secreção de interferon-tau (IFNT), produzido pelas células do trofoblasto do concepto (SPENCER e BAZER., 1996). Esta glicoproteína age de maneira parácrina no útero, inibindo a expressão dos receptores de estrógeno (ESR1) e de ocitocina (OXTR) no epitélio luminal do endométrio, evitando assim, a liberação de pulsos luteolíticos de prostaglandina F2 alfa (PGF2) (SPENCER., 2007). Além disso, esta molécula é capaz de induzir a expressão de genes

estimulados por interferon-tau (ISGs), que modulam a imunidade inata uterina, a remodelação do estroma, estimulam a hiperplasia das glândulas endometriais e o desenvolvimento vascular uterino (YOUSELF et al., 2016).

É importante lembrar que o estabelecimento e manutenção da gestação são eventos que necessitam da receptividade do endométrio e a comunicação recíproca com o embrião, sendo a capacidade do embrião em se desenvolver extremamente dependente das condições do ambiente intrauterino (SPONCHIADO et al., 2017). Uma das hipóteses investigadas a este respeito é a teoria da conversa cruzada materno-embrionária, que postula que o embrião e o endométrio são submetidos a um complexo conjunto de sinalização, antes e durante o estabelecimento da gestação. Esses eventos, preparam tanto o embrião como o endométrio para uma inibição da luteólise e uma implantação bem sucedida, induzindo alterações bioquímicas e moleculares específicas nas células endometriais e do embrião (GODAKUMARA et al., 2021).

Estudos recentes, indicam que em mamíferos, vesículas extracelulares (VEs) podem ser secretadas e sintetizadas por vários tipos celulares, incluindo células endometriais e embrionárias. VEs são vesículas envoltas em bicamadas lipídicas liberadas por células que podem transportam DNA, RNAs, lipídios e proteínas entre as células. As VEs são classificadas de acordo com o seu tamanho, biogênese e secreção, como exossomos, microvesículas, e corpos apoptóticos (GYÖRGY et al., 2011). As VEs transportam moléculas bioativas como miRNAs, mRNAs, proteínas, e lipídios, que modulam vários processos reprodutivos tais como desenvolvimento do folículo ovariano, maturação de oócitos, desenvolvimento embrionário e também comunicação materno-embrionária (SAADELDIN et al., 2015).

As VEs são um constituinte do trato reprodutivo feminino em humanos e animais domésticos com potenciais papéis biológicos no desenvolvimento folicular, bem como a maturação do oócito, a fertilização do embrião e estabelecimento da gestação (KURIAN e MODI, 2019; HOMER et al., 2017; BURNETT e NOWAK, 2016) Além disso, evidências indica que o VEs do oviduto melhoram o rendimento e a qualidade do blastocisto e estende a sobrevivência do embrião *in vitro* (ALMINANA E BAUERSACHS, 2019) Ainda, as VEs derivadas de embrião pode ser entregue no para células do epitélio e do estroma endometrial. Desta forma, o intuito deste estudo é melhor compreender a

importância que as VEs podem possuir na regulação de processos biológicos críticos durante o estabelecimento da gestação. Mais especificamente, como as VEs produzidas pelas células do trofotoderma podem atuar na comunicação com células endometriais *in vitro*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nessa revisão de literatura foram abordados os conceitos relacionados ao processo de comunicação e reconhecimento materno embrionário. Para isso, foi descrito sobre o ambiente uterino, desenvolvimento embrionário inicial, interação entre o embrião e o ambiente materno, bem como sobre a importância das vesículas extracelulares no reconhecimento materno da gestação.

2.1 Ambiente uterino

Em ruminantes a implantação está estabelecida, por volta do 42º dia da gestação. Durante todo o período que antecede a implantação o concepto utiliza-se do ambiente uterino para sua nutrição e comunicação com a mãe. Portanto, para o entendimento desse processo e a determinação de suas falhas é necessário que se conheça esse ambiente de maneira mais abrangente.

O útero é composto pelas seguintes estruturas: dois cornos, um corpo e uma cérvix. Constituído por 3 camadas distintas, a camada mais interna é a mucosa (endométrio), a camada intermediária é a muscular (miométrio) e a camada mais externa é a serosa (perímetro) (KÖNIG e LIEBICH, 2016). O endométrio uterino é um tecido complexo, constituído por diferentes tipos celulares e os principais tipos são: células epiteliais luminais, células epiteliais glandulares e estromais, que se assemelham a fibroblastos. Cada um desses tipos de células, via secreções endometriais, desempenham um papel fundamental no desenvolvimento do embrião e também na condução da gestação. No início da prenhez a sinalização local do concepto modifica o ambiente uterino e induz a secreção de proteínas específicas pelo epitélio uterino (MCCRACKEN, 1984). Especificamente, o endométrio desempenha um papel significativo entre os tecidos reprodutivos no contexto de interação inicial na

comunicação materno-embrionária (BINELLI et al., 2015), pois o bom desenvolvimento do embrião no início da prenhez depende desse ambiente uterino.

O epitélio endometrial também sintetiza, secreta e/ou transporta um composto complexo de íons, carboidratos, aminoácidos, enzimas, fatores de crescimento, hormônios, proteínas transportadoras e outras substâncias. Este composto é chamado de histotrofo (BAZER, 1975). O histotrofo é sintetizado e secretado pelas glândulas endometriais (SPENCER; BAZER, 2004) e é fonte de vitaminas, minerais, enzimas e outra miríade de nutrientes necessários para o embrião em desenvolvimento antes da implantação (MULLEN et al., 2012). Portanto, considera-se que os fatores que suportam o crescimento do conceito durante a pré e peri-implantação, sejam obtidos primariamente do histotrofo uterino (SPENCER et al., 2006). Isto demonstra a importância deste ambiente para o desenvolvimento do embrião inicial e conseqüentemente para o sucesso da gestação em ruminantes de forma geral.

2.2 Desenvolvimento embrionário

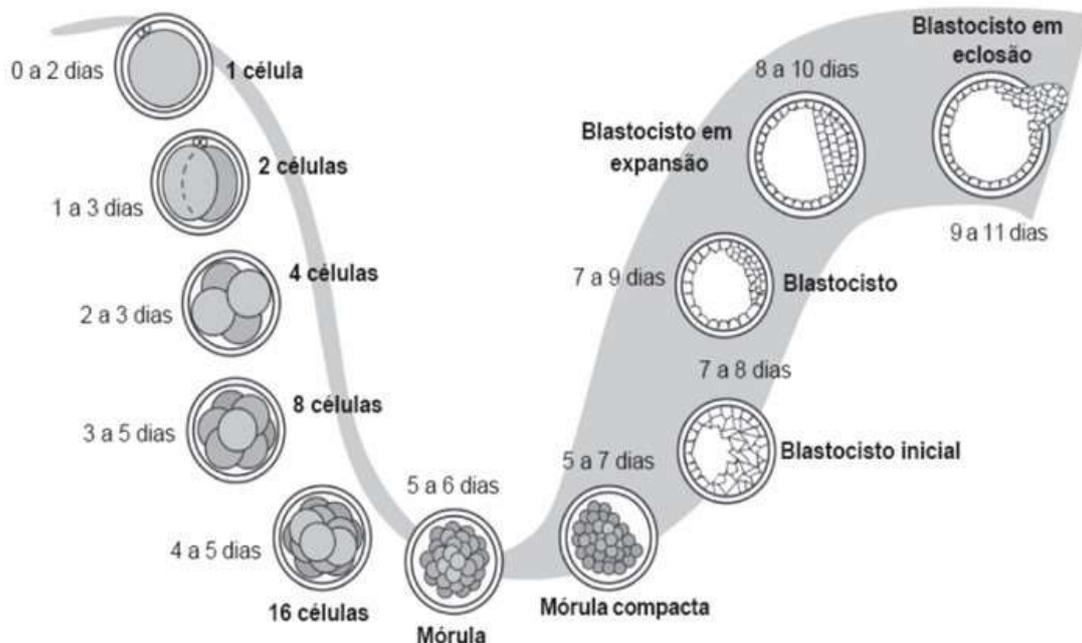
Após a fecundação, inicia-se o processo de formação do embrião (Figura 1). As fases de desenvolvimento embrionário inicial em bovinos podem ser divididas em: zigoto, clivagens, mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido (BÓ e MAPLETOFT, 2013). Quando o embrião entra no útero, por volta do 4º a 6º dia após a fertilização do oócito, ele pode se encontrar na fase de desenvolvimento de mórula à blastocisto inicial. Em seguida, ele continua seu crescimento e evolui para a forma de blastocisto, que possui duas linhagens celulares distintas, sendo uma a massa celular interna rodeada por um segundo tipo de células e uma monocamada de trofotoderma. As células da MCI são altamente adesivas e compactadas umas com as outras (SCOTT, 1997).

As células do trofotoderma (TE), por sua vez, envolvem o embrião e mandam ativamente fluidos para o interior do embrião que se acumulam formando a cavidade do blastocisto, a blastocèle. Com 8-9 dias, o embrião continua seu crescimento e ocorre o rompimento da zona pelúcida e a conseqüente eclosão do blastocisto. O blastocisto continua a crescer e modifica

a sua forma ovoide para a forma tubular e passa a ser chamado de concepto (embrião e membranas extraembrionárias). O concepto começa a alongação, com aproximadamente 15 dias em bovinos, formando um filamento que pode variar de comprimento (10 a 15 cm) e que ocupa todo o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo (DORNIK *et al.*, 2013).

Este aumento significativo no tamanho do concepto é resultado de múltiplas e sucessivas divisões celulares que as células TE sofrem constantemente. Desta maneira, a presença de uma TE funcional é essencial para as comunicações moleculares complexas que ocorrem entre o embrião e o útero (COCKBURN E ROSSANT, 2010). Em ruminantes, estas comunicações estabelecem o reconhecimento materno da gestação mediante a secreção da glicoproteína interferon-tau pelas células do TE. Além disso, é importante mencionar que a alongação do concepto não ocorre *in vitro* e também não ocorre *in vivo* na ausência de glândulas uterinas (MAMO *et al.*, 2012), demonstrando a importância do ambiente uterino para o correto desenvolvimento do concepto.

Figura 1. Desenvolvimento do embrião bovino desde embrião de uma célula ou zigoto, logo após a fertilização, até a saída da zona pelúcida (blastocisto em eclosão).



Fonte: PRESTES E LADIM-ALVARENGA, 2017

Na fase de alongação ocorre o aumento exponencial do comprimento e peso do trofotoderma (WALES e CUNEO, 1989) onde ocorre o início da

diferenciação das membranas extraembrionárias, incluindo a gastrulação do embrião, formação do saco vitelino e do alantoide, que são vitais para a sobrevivência embrionária e formação de uma placenta funcional (GUILLOMOT, 1995).

2.3 Estabelecimento da gestação em bovinos

Para o sucesso do reconhecimento materno da gestação em ruminantes é necessário que o conceito modifique sua morfologia de uma forma esférica, para uma forma tubular e posteriormente filamentosa para então produzir IFNT (SPENCER et al., 1995; ROBERTS et al., 1999; SPENCER; BAZER, 2004). No momento que o conceito passa por alterações morfológicas, o endométrio também sofre alterações para estabelecer a receptividade uterina, possibilitando o crescimento do conceito, a implantação e o estabelecimento da prenhez (BAUERSACHS; WOLF, 2012).

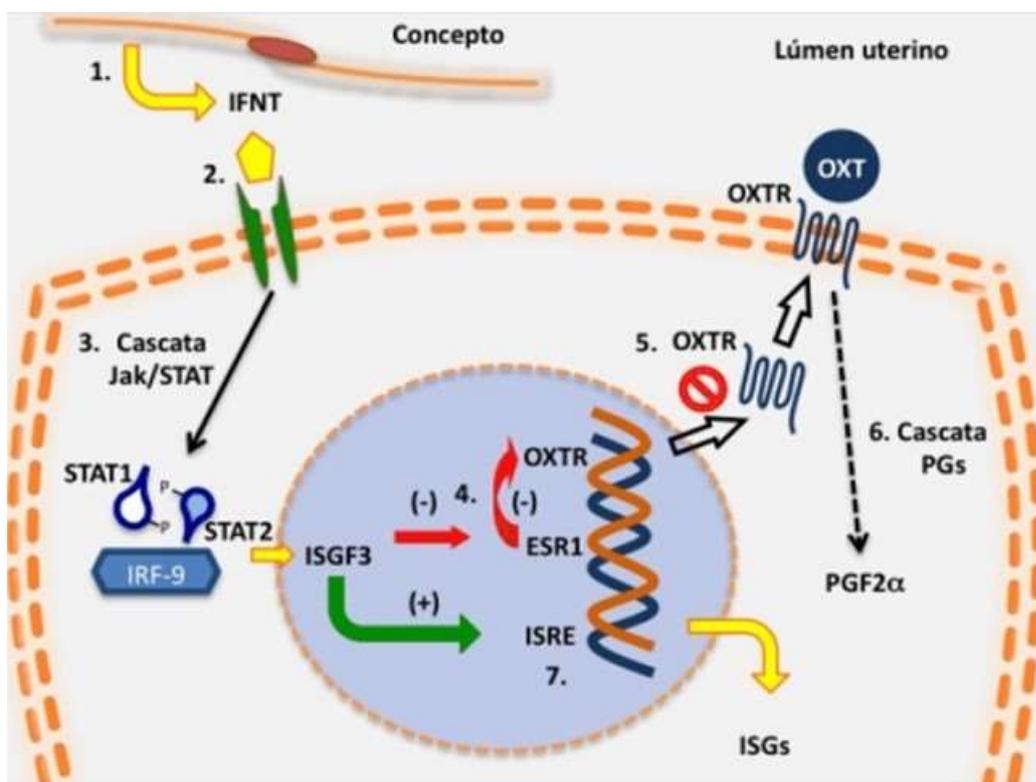
O estabelecimento da gestação em ruminantes domésticos (ovinos, bovinos e caprinos) se inicia no estágio de blastocisto e envolve sinais de reconhecimento da prenhez. Durante o período pré-implantação, as células gigantes binucleadas (CGB) do trofoblasto começam a se diferenciar a partir das células mononucleadas do trofotoderme, migram e se fundem com o epitélio luminal do endométrio, assim como entre si, para formarem as placas sinciciais multinucleadas. As CGB do trofoblasto secretam moléculas que agem nas glândulas endometriais para estimular sua diferenciação morfológica e funcional (SPENCER et al., 2006).

O reconhecimento materno da prenhez em bovinos é mediado pela ação do interferon-tau secretado pelo conceito no endométrio materno. Este período de reconhecimento culmina com a secreção de altos níveis de IFNT pelo conceito. Em bovinos, já foi observado que a máxima secreção de IFNT ocorre por volta do dia 17 da gestação (BAZER; SPENCER; OTT, 1997). Desta maneira, o sucesso da gestação após esse período inicial, depende da ação do IFNT, a fim de inibir a produção da prostaglandina F₂α (PGF₂α) pelo endométrio (FORDE; LONERGAN, 2012) e conseqüentemente, a continuidade de produção de P4 pelo CL ativo. O IFNT suprime os receptores de estradiol e o OXTR, mas

não o PGR, resultando na prevenção da liberação pulsátil da PGF₂ α pelo endométrio (SPENCER et al., 1995).

Além do IFNT, o embrião bovino aproximadamente no dia 15 de desenvolvimento também secreta prostaglandinas, como a PGF, a prostaglandina E2 (PGE2) e a prostaglandina I2 (PGI2) que atuam de maneira parácrina com o endométrio, regulando diferentemente a expressão de genes e funções que são importantes para a receptividade uterina, crescimento e desenvolvimento do conceito durante o início da gestação. A PGF aumenta a expressão de genes estimulados por interferon-tau (ISGs) (SPENCER *et al.*, 2013). O mecanismo de ação para o bloqueio da luteólise envolve a supressão na expressão dos receptores endometriais para a ocitocina (WATHES et al., 1998; MANN et al., 1999) e também a competição pelos sítios de ligação desses mesmos receptores, culminando com a inibição da síntese de PGF₂ α (DEMMERS et al., 2001).

Figura 2. Sinalização parácrina do IFNT com o endométrio no período de reconhecimento materno da gestação



Fonte: (ANTONIAZZI et al., 2011)

2.3.1 Interferon-Tau (IFNT)

Os interferons (INFs) são citocinas sintetizadas e secretadas por células somáticas nos mamíferos. A designação coletiva de interferons surgiu com estudos de Stewart (1979) que assim as nomeou por sua capacidade de interferir na biologia das células, induzindo um estado anti-viral contra diversos tipos de vírus. Na espécie bovina foram identificados diversos subtipos de INFs. Dentre os subtipos, identificou-se a expressão de interferon-tau (IFNT), que em ruminantes é responsável pelo reconhecimento materno da gestação (ROBERTS et al., 1992; ROBERTS et al., 1999).

Sabe-se que o IFNT é composto por 172 aminoácidos e apresenta 75% de homologia com o IFN- ω (EALY et al., 1998). Assim como todos IFN tipo I, o IFNT se liga às subunidades de receptores para interferons 1 e 2 (IFNAR1 e IFNAR2) (LI; ROBERTS, 1994a; LI; ROBERTS, 1994b), através dos quais ativa fatores de transcrição (ALEXENKO et al., 1997; BINELLI et al., 2001) induzindo ou inibindo a expressão de diversos genes (OTT et al., 1998; SPENCER et al., 1998). Além disso, a síntese de RNAm para IFNT inicia-se no dia 4 no estágio de 16 células no embrião resultante da fertilização *in vitro* (YAO et al., 2009). A expressão termina com a implantação, pois o contato do trofoblasto com o endométrio cessa a produção de IFNT (DEMMERS et al., 2001)

Genes que codificam IFNT foram identificados apenas em ruminantes (LEAMAN e ROBERTS, 1994). Apesar das diferenças na sequência de aminoácidos, os INFs apresentam estrutura tridimensional semelhante, compostas basicamente por regiões α -hélices arranjadas em uma “trouxa” compacta (ROBERTS et al., 1999). Tal característica estrutural, associada às propriedades biofísicas e atividades biológicas comuns, como estabilidade de atividade em pH ácido e reconhecimento de classes comuns de receptores de superfície celular, determinaram a designação coletiva dessas moléculas como o IFN do tipo 1 (MOGENSEN et al., 1999).

Em ruminantes, o IFNT é a principal molécula sinalizadora da presença do conceito no útero materno e é secretado pelas células mononucleares do

trofoblasto, no estágio precoce de desenvolvimento embrionário (THATCHER et al., 2001). Nos bovinos, observa-se que a secreção de IFNT pelo trofotoderma inicia-se ao redor do sétimo dia de gestação, atingindo o pico máximo no dia 17 de desenvolvimento (BARTOL et al., 1985; GEISERT et al., 1988).

O crescimento e desenvolvimento do concepto necessita da ação da progesterona e hormônios placentários no útero para regular a diferenciação e função endometrial, a sinalização do reconhecimento da prenhez, a receptividade do útero para a implantação do blastocisto (SPENCER; BAZER et al., 2004). Em síntese, entre os fatores que atuam no reconhecimento materno da gestação, ressalta-se a importância dos hormônios maternos envolvidos na preparação do ambiente uterino e as moléculas liberadas pelo concepto que tem ação no endométrio.

2.3.2 Função da progesterona (P4) no ambiente materno embrionário

A progesterona desempenha um papel vital no início da gestação, pois atua no epitélio endometrial para induzir a secreção de fatores necessários para o bom desenvolvimento do embrião. Desta forma, a sincronia entre o embrião e o endométrio é regulada no momento do aumento da concentração da progesterona pós-ovulatória. Estudos já demonstraram que o nível de progesterona é mais elevado em vacas prenhes do que em vacas não prenhes (SREENAN e DISKIN, 1983). Além disso, é provável que tanto o aumento da concentração como o tempo de aumento da progesterona plasmática durante a fase lútea, sejam fatores importantes na manutenção da prenhez. MANN E LAMMING, 2001 mostraram que, dentro de um grupo de vacas com um embrião no dia 16, as vacas com embriões pouco desenvolvidos sofreram um aumento tardio da concentração de progesterona após a ovulação, em comparação com as vacas com embriões bem desenvolvidos.

Considerando que o tempo de aumento da progesterona é importante para o desenvolvimento do embrião, a alta concentração de progesterona é importante para prevenir a luteólise, uma vez que vacas com menores concentrações de progesterona plasmática são mais susceptíveis à perda embrionária. Experimentos com vacas ovariectomizadas e tratadas com

progesterona mostraram que uma baixa concentração plasmática de progesterona resulta no desenvolvimento de um sinal luteolítico mais forte (MANN E LAMMING, 1995). Também foi demonstrado que a produção de IFNT pelo conceito está positivamente correlacionada com a concentração plasmática de progesterona da mãe (KERBLER et al., 1997). Isso mostra que a progesterona plasmática baixa pode influenciar o desenvolvimento do embrião, presumivelmente alterando as secreções do endométrio, o que resulta na diminuição da secreção de IFNT. Assim, em vacas com baixas concentrações de progesterona durante a fase lútea, o embrião secreta menos IFNT e é mais difícil para o IFNT impedir a secreção de PGF2 α . Isso poderia explicar a maior perda embrionária nesses animais.

2.4 Vesículas extracelulares (VEs)

As vesículas extracelulares (VEs) são nanopartículas secretadas por variados tipos de células e são compostas por uma bicamada fosfolipídica. A distinção das VEs é baseada no tamanho, podendo ser classificados como: exossomos com tamanho entre 30 a 150 nm; microvesículas entre 100 a 1000 nm e corpos apoptóticos entre 1 a 5 μ m. A biossíntese de exossomos envolve a formação corpos multivesiculares (*Multivesicular Bodies*–MVB) a partir de uma primeira endocitose e formação de vesículas intraluminais (ILV) em seu interior. As ILVs são liberadas ao meio extracelular após fusão dos MVB com a parte interna da membrana plasmática, resultando na liberação das ILV, as quais são chamadas de exossomos (MATHIVANAN et al., 2010; PAN et al., 1985; THÉRY et al., 2002).

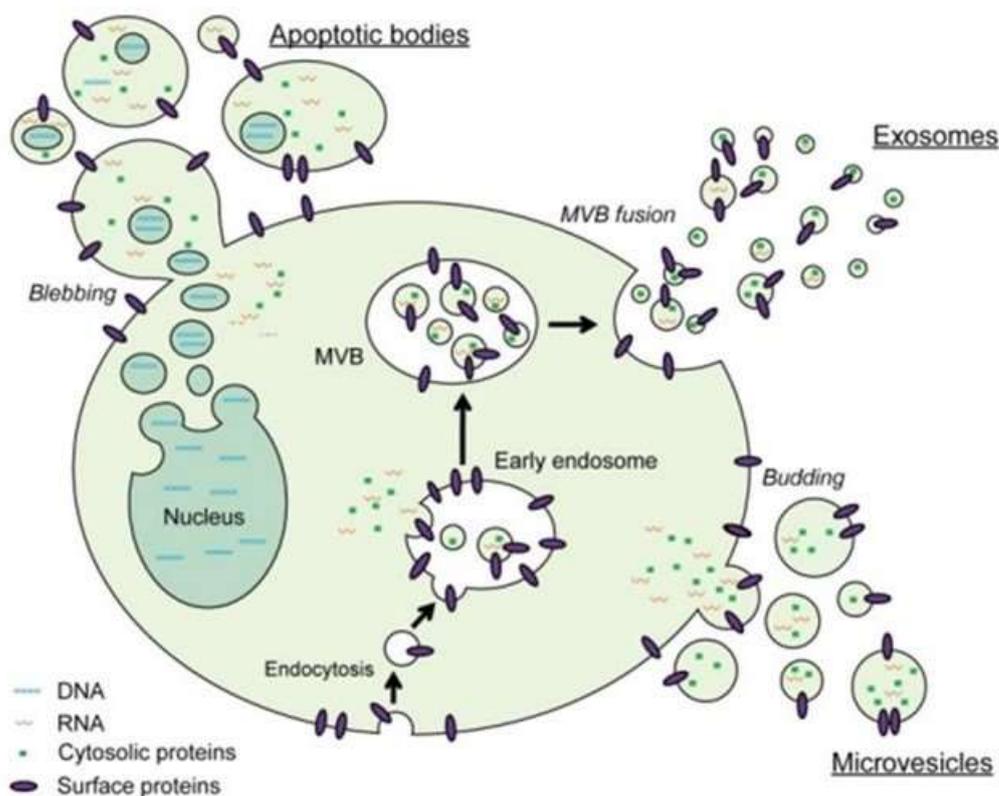
Já as microvesículas são formadas a partir de liberações por brotamento da membrana plasmática em resposta a estímulos ou estresse (COCUCCI; RACCHETTI; MELDOLESI, 2009; TANNETTA et al., 2014; THÉRY et al., 2002) e corpos apoptóticos são liberados das células em processos de apoptose, podendo conter organelas e fragmento nuclear (PAVANI et al., 2017).

O conteúdo de proteínas encontradas nas VEs é semelhante ao da célula de origem, o que indica funções especializadas (SIMPSON; JENSEN; LIM, 2008). Entretanto, não há marcadores específicos para cada subtipo de VEs,

apesar de algumas proteínas, como HSP70, Alix, TSG101, clathrin, CD63, CD81 e CD9 serem abundantes em exossomos (MATHIVANAN et al., 2010).

Apesar das divergências entre os subtipos de VEs, exossomos e microvesículas possuem ações importantes em processos biológicos (Figura 3). Essas moléculas bioativas, possuem material bioativo como RNAm e microRNAs (VALADI et al., 2007), proteínas (SIMPSON et al., 2008) e lipídios (SUBRA et al., 2007), que caracterizam suas funções de modulação em células receptoras. Os mecanismos de comunicação entre VEs e células-alvo incluem: 1) Interação entre as proteínas de membrana que ativam células alvo; 2) Ligação de produto de clivagem de proteínas de membrana das VEs em receptores de células alvo; 3) Transferência de moléculas a partir da fusão de VEs e célula alvo (MATHIVANAN; JI; SIMPSON, 2010) 4) Endocitose método de captação onde o conteúdo seria liberado no citoplasma após a fusão da membrana intracelular (RAPOSO e STOORVOGEL, 2013)

Figura 3. Esquema de como diferentes tipos de vesículas extracelulares são secretados



Fonte: TANNETA et al. 2014

Os exossomos, uma subcategoria de VEs, vêm se destacando por estarem envolvidos em mecanismos regulatórios em eventos reprodutivos. Os exossomos caracterizam-se por serem nanovesículas, derivadas da membrana celular que carregam lipídeos, proteínas, RNAs e miRNAs (MATHIVANAN et al., 2010), capazes de controlar vias regulatórias associadas a patologias e rotas fisiológicas (NG et al., 2013).

A comunicação intercelular pode ser mediada pelos exossomos através da transferência de informação para células receptoras, onde desempenham uma função fundamental na regulação de processos fisiológicos e patológicos através de redes reguladoras de genes e através da programação epigenética (LEE et al., 2012). Os exossomos, dependendo da célula de origem, parecem estar envolvidos em uma série de processos, pois eles se fundem com a membrana plasmática da célula receptora liberando seu conteúdo para dentro da célula alvo (NG et al., 2013).

Evidências sobre a secreção de exossomos tem sido demonstrada em vários tipos celulares, incluindo células tronco embrionárias e embriões produzidos *in vitro* (KROPP et al., 2014). No início da gestação, é necessário que ocorra uma comunicação entre o conceito e o ambiente materno, podendo ser essa também mediada por exossomos de origem materna ou fetal onde o reconhecimento materno da gestação ocorrerá com sucesso (TANNETTA et al., 2014). O embrião no período de pré-implantação e o endométrio materno são capazes de secretar vesículas extracelulares (SAADELDIN et al., 2015).

O microambiente uterino é um fator essencial para que ocorra a implantação do embrião (MAMO et al., 2012). Além de outros eventos reprodutivos que são essenciais para que uma gestação tenha sucesso, como na proliferação celular, comunicação entre o organismo materno e o conceito e, na aderência embrionária, assim, os exossomos participam de comunicações intercelulares dentro desses eventos. (SAADELDIN et al., 2015).

As vesículas extracelulares são um constituinte do trato reprodutivo em animais domésticos com potenciais papéis biológicos no folicular desenvolvimento bem como a maturação do oócito, a fertilização do embrião e estabelecimento da gestação (KURIN e MODI, 2019; HOMER et al., 2017; BURNETT e NOWAK, 2016) Os exossomos e MV são abundantemente detectados em lúmen uterino de ovelhas férteis na fase secretora como bem

como ovelhas (RUIZ-GONZALEZ et al., 2015) e bovinos (KUSAMA et al., 2018). No geral, esses estudos apoiam a ideia de que VEs contendo miRNAs, RNAs e proteínas selecionados estão presentes no lúmen uterino e provavelmente têm um papel biológico na interações materno-embriônica importantes para o estabelecimento e manutenção da gestação.

3 HIPÓTESE

A hipótese central do presente projeto é que células endometriais e do trofotoderma de embriões PIV cultivadas *in vitro* produzem VEs que atuam diretamente na comunicação materno-embriônica em bovinos.

As hipóteses específicas do presente projeto são:

- 1) Células endometriais e do trofotoderma de embriões FIV são capazes de produzir VEs *in vitro*.
- 2) As VEs produzidas pelas células endometriais cultivadas *in vitro* alteram os níveis de expressão de genes das células do trofotoderma.
- 3) As VEs produzidas pelas células do trofotoderma cultivadas de embriões FIV alteram os níveis de expressão de genes das células endometriais relacionados ao reconhecimento materno da gestação.

4 OBJETIVOS

O objetivo geral do presente projeto é gerar um modelo de estudo *in vitro* de liberação de VEs utilizando células endometriais e do trofotoderma de embriões FIV que atuem nas comunicações materno-embriônica em bovinos.

Os objetivos específicos do projeto são:

- 1) Quantificar e caracterizar as VEs produzidas e liberadas por células endometriais e do trofotoderma de embriões bovinos FIV.

2) Avaliar os níveis de expressão de genes e importantes vias que atuam, das células do trofotoderma de embriões FIV tratadas com as VEs endometriais.

3) Avaliar os níveis de expressão de genes e importantes vias que atuam, das células endometriais, relacionados ao reconhecimento materno da gestação, tratadas com VEs do trofotoderma de embriões FIV.

5 DESENHO EXPERIMENTAL

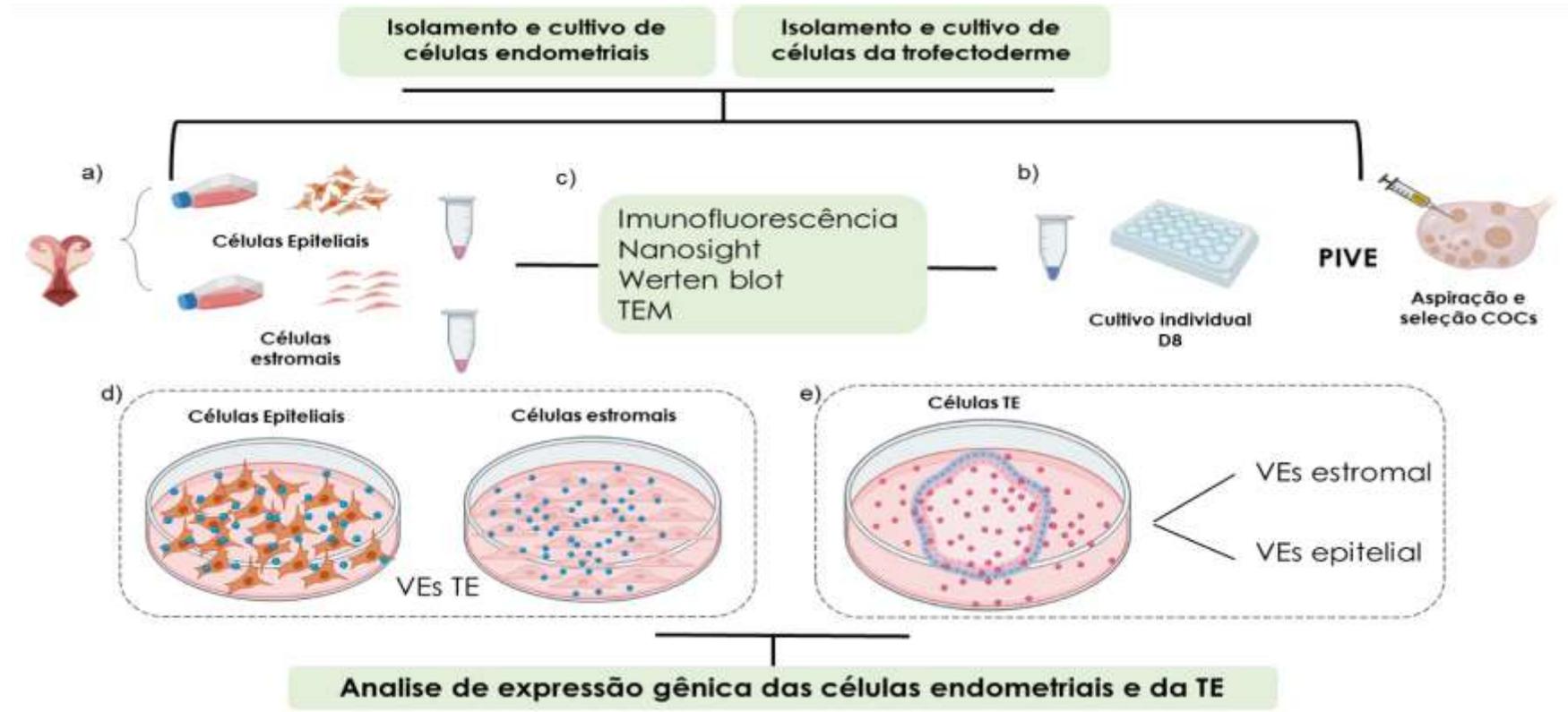


Figura 4. Esquema ilustrativo das etapas de coleta e caracterização das VEs produzidas pelos blastocistos FIV e células endometriais *in vitro*. A) Isolamento e cultivo das células endometriais. b) Isolamento e cultivo de células do trofoblaste através da PIVE. Os blastocistos FIV eclodidos no D8 foram individualmente colocados em placas de cultura para isolamento das células do trofoblaste. c) As células endometriais e células do trofoblaste cultivadas *in vitro* foram caracterizadas através de imunofluorescência utilizando epifluorescência invertida com os filtros apropriados. As vesículas extracelulares isoladas do meio de cultivo das células endometriais e células do trofoblaste, foram centrifugadas para obtenção dos exossomos. Foram realizados a quantificação e caracterização das VEs por NanoSight, Western blotting e Microscopia de Transmissão (TEM). d) Foram realizados os tratamentos das células endometriais com VEs produzidas por células do trofoblaste de embriões FIV. e) Tratamento das células do trofoblaste com VEs das células endometriais e posteriormente a análise da expressão gênica das células endometriais e do trofoblaste após as 6 horas de tratamento.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Cultivo primário e isolamento das células endometriais

Para o isolamento das células endometriais, úteros de vacas não gestantes foram obtidos em matadouro local. Foram utilizados apenas os úteros da fase lútea inicial do grau II ao III (Dia 7, aproximadamente) que foram selecionados visualmente com base na fase do corpo lúteo conforme descrito (IRELAND et al 1980). O tecido dissecado foi do corno uterino ipsi lateral e apenas a região intercaruncular foi coletado. O tecido foi incubado em 2 mL de solução de digestão, contendo colagenase (1g/mL) diluída em PBS por 3 hora a 38,5°C. O precipitado foi recuperado em novo tubo e centrifugado a 300 g por 10 min. O *Pellet* resultante, contendo células epiteliais e estromais, foi diluído em meio de cultura (DMEM F12) contendo 10% de FBS, estreptomina (50 µg/mL), penicilina (50 IU/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL). A população de células heterogêneas foi semeada a 1×10^4 células/mL em garrafas de cultivo de 75 cm². Após 2 dias de cultivo, as células estromais e epiteliais foram separadas por tempos de plaqueamento diferencial, conforme descrito anteriormente (MACKINTOSH et al., 2013). As células estromais e epiteliais foram separadas por tempos e concentrações diferentes de exposição a tripsina. Pra isolar as células estromais das epiteliais foi utilizado tripsina 0,025% por 5 min. Após esse tempo, o meio foi recuperado, centrifugado e as células estromais, foram plaqueadas na mesma concentração anterior em uma nova garrafa de 75 cm². A garrafa contendo as células epiteliais foi lavada com PBS sem Ca²⁺ e Mg²⁺ por 3 vezes para garantir a retirada de possíveis células estromais. Meio fresco foi adicionado e as células epiteliais ainda aderidas na placa voltaram para o cultivo. Após 48h de cultivo, caso ainda permanecesse algumas células estromais nos fracos, o mesmo procedimento foi repetido até obter uma população epitelial e estromal homogênea. Foram realizadas as passagens com as células epiteliais somente quando alcançavam 80% de confluência.

6.2 Caracterização por imunofluorescência das células endometriais

Para a imunofluorescência, as células epiteliais e estromais foram semeadas individualmente em placas de 35mm sobre lamínulas de 24mm². Após 48h foram fixadas em PBS com 4% PFA por 15 min, permeabilizadas por 30 min com 1% de Triton (X-100; Sigma) e 0,05% de Tween-20. O bloqueio foi realizado por 60 min a temperatura ambiente em PBS contendo 3% BSA, 0,05% de Tween-20 e 23 mg/ml de glicina. Após o bloqueio, as células foram lavadas em PBS com 0,01% de Tween-20 por 15 min e incubadas durante a noite em 4°C com 500 µL (1:500) de uma solução primária de anticorpo monoclonal anti-vimentina e anti-citoqueratina de coelho em PBS com 1% de BSA. No dia seguinte, as células foram lavadas e incubadas durante 1h com uma solução de anticorpos secundários constituída de anticorpos IgG de coelho conjugados ao Alexa Fluor 488. Posteriormente as células foram incubadas por 15 min com 1 µg/mL de Hoechst (33342 (5 µg / mL) em PBS. Após o período de incubação com Hoechst, as lamínulas contendo as células epiteliais e estromais foram colocadas em lâmina com Prolong e foram visualizadas usando um microscópio de epifluorescência invertida com os filtros apropriados.

6.3 Isolamento das VEs produzidas por células endometriais no meio de cultivo

O meio de cultivo das células epiteliais e estromais foram obtidos separadamente para o isolamento de VEs presentes no mesmo. Estes meios foram centrifugados a 300g por 10 minutos para retirada de células, 2.000g por 15 minutos para retirada de *debris* celulares, 16.500g por 30 minutos para retirada de VEs maiores. As centrifugações foram realizadas em temperatura de 4°C. Para obtenção de conteúdo enriquecido em VEs menores que 200 nm, meios foram filtrados em filtro com poro de <0,22 µm (Kasvi) e ultracentrifugados a 34.100g por 70 minutos a 4°C (Optima XE-90 Ultracentrifuge; rotor 70 Ti; Beckman Coulter). Após a primeira ultracentrifugação o *pellet* foi diluído em tampão fosfato-salino (1xPBS) livre de cálcio e magnésio e ultracentrifugado novamente a 34.100 RPM por 70 minutos a 4°C. O *pellet* obtido a partir da segunda centrifugação foi diluído em 20 µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio conforme a utilização das VEs.

6.4 Obtenção dos ovários, seleção dos oócitos e maturação *in vitro* (MIV)

Ovários bovinos foram coletados em um abatedouro local e transportados para o laboratório em solução fisiológica (NaCl 0,9%) aquecida a 37°C. Os folículos dos ovários com 3-6mm de diâmetro foram aspirados um a um com o auxílio de uma agulha (40x12) acoplada em uma seringa (10mL) estéril. Todo o líquido folicular aspirado foi depositado em tubos cônicos (50mL) estéreis. Os complexos *cumulus* oócitos (CCOs) aspirados foram selecionados com o auxílio de estereomicroscópio. Os CCOs foram selecionados quando a qualidade e somente os considerados grau I e II e III foram utilizados para a produção dos embriões. A classificação dos oócitos foram segundo LONERGAN (1992), em 5 grupos de qualidade, onde Grau I: células do *cumulus* compacto presente, contendo mais de três camadas de células; Grau II: células do *cumulus* compacto parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares; Grau III: células do *cumulus* presente, com apenas uma camada de célula; Grau IV: desnudo, ou seja, ausência de camada de células do *cumulus* ou Grau V: atrésicos, no qual as células do *cumulus* estão em regressão celular. A maturação *in vitro* foi realizada por 22 horas em meio de maturação [TCM 199 suplementado com 10% de SBF, 5,0 µg/mL de hormônio luteinizante (Lutropia-V, Vetrepharm), 0,5 µg/ml de hormônio folículo estimulante (Folltropin-V, Vetrepharm), 0,2 mM de piruvato e 50 µg/mL de gentamicina]. A MIV foi realizada em gotas de 100 µL (\pm 20 oócitos por gota), em atmosfera de 5% de CO₂ sob óleo mineral a 38,5 °C.

6.5 Fecundação *in vitro* (FIV)

Os oócitos foram fecundados após 22 horas de maturação *in vitro* com sêmen descongelado de um único touro e de uma mesma partida. O sêmen foi preparado de acordo com a técnica de gradiente *Percoll* e a fertilização foi realizada em meio TALP (PARRISH et al., 1988), suplementado com 2 µM de penicilamina, 1 µM de hipotaurina, 250 µM epinefrina e 20 µg/ml de heparina. Para a fecundação foram adicionados 2x10⁶ de espermatozoides/mL. Passados 8 horas de fertilização (SANGALLI et al., 2022).

6.6 Cultivo *in vitro* (FIV)

Os zigotos presumíveis foram parcialmente desnudados mecanicamente por sucessivas pipetagem em meio de lavagem. Em seguida, foram lavados três vezes em meio de cultivo SOF (synthetic oviductal fluid) (HOLM et al., 1999) e transferidos para o cultivo *in vitro*. O CIV foi realizado em meio de cultivo SOF suplementado com 2,5% SBF, piruvato 0,2 mM e 50 µg/mL de gentamicina. Foram cultivados entre 15 à 20 embriões por gota de 100µL de meio sobre uma monocamada de células do *cumulus*. O cultivo foi realizado por oito dias (a fertilização é considerada o Dia 0), nas mesmas condições atmosféricas utilizadas anteriormente na MIV. Foram avaliadas as taxas de clivagem no terceiro dia (D3, 72 horas de cultivo), a taxa de produção de blastocisto no sétimo dia (D7, 168 horas de cultivo) e a taxa de eclosão dos blastocistos no oitavo dia (D8, 192 horas de cultivo).

6.7 Isolamento das células do trofotoderma dos blastocistos FIV

Os blastocistos eclodidos no D8 foram selecionados e cultivados individualmente em placas de cultivo de 24 poços. Anteriormente, os poços foram revestidos com 1mg/mL de matrigel (corning). Para cada poço de cultivo foram adicionados 300µL de matrigel. As placas foram mantidas a temperatura ambiente (TA) por 30 min para a polimerização e em seguida mais 30 minutos na estufa à 38.5° C. Após este período os poços foram lavados com meio de cultivo e 500µL de meio fresco foi adicionado. O meio de cultivo utilizado foi DMEM F-12 suplementado com 10% de FBS, 50% de meio condicionado de fibroblastos fetais, 10µL/mL de beta-mercaptoetanol e estreptomicina (50µg/mL), penicilina (50 IU/mL). As trocas de meio foram realizadas a cada 48 horas. Após aproximadamente sete dias de cultivo, quando as células do trofoblasto estavam bem estabelecidas, foram repicadas de forma mecânica, com auxílio de agulha hipodérmica (25 x 7) e cultivadas novamente em placas de 24 poços revestidos de matrigel. Uma mesma linhagem de célula do trofotoderma foram divididos em 3 poços para melhor aproveitamento das células e do meio de cultivo. Quando as células atingiram uma quantidade celular adequada,

aproximadamente 70% do poço em cultivo, foram desagregadas e cultivadas novamente como nas vezes anteriores.

6.8 Caracterização por imunofluorescência das células do trofectoderma

Para a imunocitoquímica, as células do TE foram cultivadas sob lamínulas histológicas circulares (13mm) estéreis em placas de 24 poços. Após 92h, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS (pH 7,4) a TA durante 15 min. Após três lavagens com PBS, as células foram bloqueadas e permeabilizadas com PBS contendo 10% de soro de cabra e 0,5% de Triton X-100 por 30 min em TA. A incubação com o anticorpo monoclonal de camundongo (diluído 1:1000) ou policlonal de coelho (1:8.000) anti-CDX2 foram realizadas em PBS contendo 1% de BSA e 0,3% de Triton X-100 por 2 h em TA. Após esta etapa, três lavagens com PBS, anticorpo IgG de cabra anti-mouse conjugado com anticorpo IgG de cabra anti-rabbit conjugado com Alexa 488 (1:200) em PBS contendo 1% de BSA e 0,3% de Triton X-100 foi aplicado durante 1 h à TA. Para marcação dos núcleos as células do trofectoderma foram incubados com Hoechst (1 µL/mL) que foi adicionado à solução do anticorpo. Após três lavagens com PBS por 10 min cada, as laminolas foram colocadas em lâminas com Prolong para a visualização de CDX2 e Hoechst usando um microscópio de epifluorescência invertida com os filtros apropriados.

6.9 Isolamento das VEs produzidas por células do trofectoderma no meio de cultivo

As vesículas extracelulares foram isoladas a partir do meio de cultivo das células do TE geradas dos blastocistos FIV (aproximadamente 1.500µL por amostra) para isto, um conjunto de três centrifugações seriadas a 4°C foram realizadas com intuito de retirar as células, os *debris* celulares e as microvesículas extracelulares, respectivamente. Na primeira etapa, o meio de cultivo foi centrifugado a 300g por 10 min. Após esta primeira etapa, o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo estéril. A segunda centrifugação foi realizada a 2.000g por 10 min. Finalizando a centrifugação, o

sobrenadante foi novamente transferido para um tubo estéril e será centrifugado a 16.500g por 30 min. Para o isolamento de enriquecido de exossomos, o meio sobrenadante das amostras foram transferidos para os tubos específico para ultracentrifugação e foram centrifugadas duas vezes a 34.100 RPM por 70 minutos a 4°C. O *pellet* formado a partir de cada amostra foi ressuspensionado em 20uL de PBS para obtenção da concentração final.

6.10 Quantificação e caracterização das VEs produzidas pelas células endometriais e do trofocotoderma

O *pellet* de VEs após a ultracentrifugação foi ressuspensionado em PBS e retirado uma alíquota para análise no Nanosight (NTA), *Western blotting* e por microscopia eletrônica de transmissão (TEM). Foram então avaliadas com o auxílio do Nanosight (Malvern, Inc) para a determinação do tamanho e da concentração de partículas por mL de meio. O fator de diluição utilizado para leitura foi de 1:1000 para VEs isoladas de células endometriais e 1:500 em VEs isoladas de células do trofocotoderma, ambos em 1xPBS livre de cálcio e magnésio. Foram realizados 5 vídeos de 30 segundos em cada amostra analisada, capturados pela câmera sCMOS em *Camera Level 12* e temperatura controlada a 38.5 °C. As análises foram realizadas considerando *threshold 5*.

Outra alíquota das VEs foram ressuspensionado, nesse caso, em RIPA (Lysis Buffer System) um tampão de lise tecidual e celular com inibidores de protease para caracterização por *Western blotting* (WB). Em 10 µL de VEs ressuspensionado em RIPA, foi adicionada solução de Laemmli e 2-mercaptoethanol 4x (Bio-Rad), em seguida as amostras foram submetidas a 95°C durante 5 minutos para desnaturar as proteínas e centrifugadas a 10.000 rpm durante 1 minuto. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE poliacrilamida 10% (456-1033, Mini-PROTEAN TGX, Bio-rad), o qual foi mantido em câmara com tampão de corrida Tris/Glicina/SDS 1x (161-0772, Bio-rad). A corrida foi realizada a 100 V durante aproximadamente 90 minutos e então foi realizada transferência semi-seca para membrana de PVDF (1704156, Trans-Blot Turbo, Biorad). Após transferência a membrana foi lavada em *Tris buffered saline* com Tween- 20 (100 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 50 mM Tris, pH 7.4; 1XTBST) e mantida por 1 hora em solução de bloqueio (5% de BSA, albumina sérica bovina, em 1xTBST). Em

seguida, a membrana foi retirada do bloqueio e incubada com anticorpos primários overnight a 4°C. As proteínas estudadas foram ALIX e GRP78. Após o período de incubação a membrana foi lavada três vezes 1XTBST durante 5 minutos e mantida durante 1 hora em anticorpo secundário anti-cabra (1:4000, SC-2020, Santa Cruz) e anti-camundongo (1:4000, #7076S, Cell Signaling Technology) conjugados a HRP (*horseradish peroxidase*). Por fim, foram retirados os anticorpos secundários, a membrana foi lavada três vezes por 5 minutos em 1XTBST e exposta à solução de detecção (170-5060, Clarity Western ECL) e análise realizada pelo aparelho ChemiDoc MP Image System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

A microscopia eletrônica de transmissão foi realizada para visualizar a morfologia das VEs. Em resumo, as VEs de três *pools* de meio de cultivo foram isoladas por ultracentrifugação e os *pellets* de foram fixados com 2,5% de glutaraldeído, 0,1 M de cacodilato e 4% de paraformaldeído (pH 7,2 a 7,4) por 2 h em TA. Em seguida, foi realizada ultracentrifugação (120.000g por 70 min a 4°C) e os *pellets* de VEs foram ressuspensos em água ultrapura (Milli-Q; Millipore Corporation, Merk, Burlington, MA, EUA). As VEs isoladas foram diluídas em 100 µL de água ultrapura e colocados em uma grade de cobre revestida com Pioloform® (Agar Scientific, Essex, Reino Unido) por 5 min. A grade foi imediatamente colocada numa gota de acetato de uranilo aquoso a 2% durante 3 min. O excesso de solução foi retirado e a leitura foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (FEI de 200kV, emissor modelo Tecnai20 LAB6).

6.11 Absorção de VEs do trofocodermia pelas células endometriais e absorção das VEs das células endometriais pelo trofocodermia.

O meio de cultivo das células do trofocodermia foram recuperados para o isolamento de VEs presentes. Estes meios foram centrifugados a 300g por 10 minutos para retirada de células, 2.000g por 15 minutos para retirada de *debris* celulares, 16.500g por 30 minutos para retirada de VEs maiores. As centrifugações foram realizadas em temperatura de 4°C. Para obtenção de conteúdo enriquecido em VEs menores que 200 nm, o meio foi filtrado em filtro de seringa com poro de 0,22 µm (Kasvi) e ultracentrifugados a 34.100RPM por 70 minutos a 4°C (Optima XE-90 Ultracentrifuge; rotor 70 Ti; Beckman Coulter).

Após a primeira ultracentrifugação o *pellet* foi diluído em tampão fosfato-salino (1xPBS) livre de cálcio e magnésio e ultracentrifugado novamente a 34.100 g por 70 minutos a 4°C. O *pellet* obtido a partir da segunda centrifugação foi diluído em 60 µL de 1xPBS livre de cálcio e magnésio conforme a utilização das VEs. Após o isolamento das VEs, uma alíquota de 30 µL foi marcado com PKH26 e os outros 30 µL da mesma amostra foi utilizado para controle negativo (sem marcação com PKH26). Foi realizado a preparação do diluente C com PKH26 e em tubo de UC no controle positivo e adicionado PBS + diluente C na amostra controle. As amostras de VEs foram incubadas ambas amostras durante 15 minutos a 38,5°C e posteriormente inativadas com PBS + 1% de BSA deixando 1 minuto em TA. Após o período de inativação, foi adicionado 1mL de PBS e novamente as VEs foram ultracentrifugadas a 100.000g durante 30 minutos a 4°C. Após a ultracentrifugação as VEs foram ressuspensas em 2 ml de PBS para lavagem do corante (PKH26) e ultracentrifugados novamente a 100.000g durante 30 minutos a 4°C.

As células epiteliais e estromais foram plaqueadas 48h antes do isolamento das VEs em placas de 6 poços sobre lamínulas de 24mm² para a incubação com VEs isoladas de células do trofocodermia marcadas com PKH26. As VEs marcadas foram adicionadas as placas de cultivo contendo as células epiteliais e estromais no mesmo meio de cultivo descrito anteriormente, por 3 horas. Após esse período, o meio contendo as VEs marcadas, foram retirados. As células epiteliais e estromais foram fixadas em PBS com 4% PFA por 15 min, permeabilizadas por 30 min com 1% de Triton (X-100; Sigma) e 0,05% de Tween-20. No dia seguinte, as células foram lavadas e incubadas durante 30 minutos com anticorpo conjugado anti-Actina e Alexafluor 488. Posteriormente as células foram incubadas por 15 min com 1 µg/mL de Hoechst (33342 (5 µg/mL) em PBS. Após o período de incubação com Hoechst, as lamínulas contendo as células epiteliais e estromais foram colocadas em lâmina com Prolong e foram visualizadas usando um microscópio de epifluorescência invertida com os filtros apropriados. O mesmo foi realizado para identificar a absorção de VEs originadas de células endometriais por células do trofocodermia.

6.12 Tratamento das células endometriais com VEs produzidas por células do trofotoderma de embriões FIV e tratamento das células do trofotoderma com VEs das células endometriais

As células epiteliais e estromais foram cultivadas separadamente em garrafas de cultivo (75cm²) em meio DMEM F12 suplementado com 10% SFB e antibióticos (penicilina 50IU/mL, estreptomicina 50µg/mL). As células do trofotoderma foram cultivadas em placas de 24 poços com meio DMEM-F12 com 10% de SFB, 50µM de beta-mercaptoetanol e com uma proporção de 1:1 de meio condicionado de MEF e antibióticos. Após 48h de cultivo, as monocamadas (epiteliais, estromais e do trofotoderma) foram tripsinizadas e semeadas individualmente em placas de 24 poços (Nunc, Dinamarca) em uma concentração de 5x10⁴ células por poço. Após 24h, as células endometriais foram suplementadas com as VEs produzidas pelas células do trofotoderma e vice e versa no mesmo meio que foram inicialmente cultivadas, agora, com 10% SFB depletado de VEs e as células do trofotoderma, livres de MEF. Com relação à quantidade de VEs utilizadas para suplementação das linhagens foram mantidas a proporção (1:1) células endometriais/trofotoderma. Para isso, o *pellet* de VEs recuperado de um cultivo celular contendo a mesma quantidade de células (5x10⁴ por poço) foram dissolvidos em 500uL de meio de cultivo fresco para cada tratamento descrito anteriormente. Posteriormente, o meio de cultivo contendo as VEs foram adicionados nos respectivos tratamentos (epiteliais, estromais e do trofotoderma) e permaneceram em cultivo por 6 horas uma atmosfera umidificada com 5% CO² a 38,5°C.

6.13 Preparação e sequenciamento da biblioteca de RNA

Após as 6 horas de tratamento, as células endometriais e do trofotoderma foram tripsinizadas e armazenadas em -80°C para análise de sequenciamento de RNA (RNAseq). Para tanto, o RNA total foi extraído usando o Pico Pure RNA Isolation Kit (Cat. # KIT0204; ThermoFisher Scientific), tratado com DNase livre de RNase (Qiagen, Hilden, Rhine-Westphalia, Alemanha) e ressuspenso em 7 uL do Elution Buffer (que acompanha o Pico Pure RNA Isolation Kit). A integridade e as quantidades de RNA foram avaliadas por meio

do chip RNA 6000 Pico Kit e do 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). O kit SMART-Seq HT (Takara Bio Inc, Kusatsu, Kansai, Japão) foi usado para síntese e amplificado de cDNA, enquanto as bibliotecas foram preparadas usando o Nextera XT DNA Library Prep (Illumina, San Diego, CA, EUA). O sequenciamento foi realizado no NexSeq 2000 (Illumina) levando em consideração leituras de 2x100 bp.

6.14 Quantificação de transcritos globais e comparação entre amostras de grupos experimentais.

Os dados foram processados por meio do software R, no qual observamos principalmente a classificação, intensidade e diferença de expressão entre os grupos. A qualidade das leituras foi avaliada usando FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). Os fragmentos foram cortadas utilizando Trimgalore, onde fragmentos menores de 30bp foram descartados. Para o mapeamento utilizamos o alinhador STAR (Dobin et al., 2019) separadamente com a referência ENSEMBL e NCBI (ARS-UCD1.2). Os fragmentos mapeados foram contados separadamente utilizando o `featureCounts` (Liao et al., 2014, 2019) para contagem de genes. Uma vez identificados os genes, a análise de expressão diferencial foi realizada entre os grupos usando DESeq2 (Love et al., 2014) considerando um $p_{adj} < 0.1$ e um $\log_2 \text{FoldChange}$ absoluto > 0.5 . Ademais, genes expressos em um grupo (expressos em todas as amostras do mesmo grupo) e não expressos no outro grupo (contagem zero em todas as amostras do mesmo grupo) foram também considerados como diferentes (`filterByExpr` do pacote `edgeR`) (Robinson et al., 2010). Os Hub genes foram analisados usando o pacote `CeTF` (Oliveira de Biagi et al., 2021) com base no RIF – Fator de Impacto Regulatório e PCIT – Correlação Parcial e Teoria da Informação (Reverter & Chan, 2008; Reverter et al., 2010). As análises de ontologia genética foram realizadas usando `clusterProfiler` (Yu et al., 2012) e as vias foram exploradas usando `Pathview` (Luo & Brouwer, 2013). Nós utilizamos pacotes adicionais como `ggplot2`, `pheatmap`, `SummarisedExperiment`, `dplyr`, e `tidyr` para a manipulação de tabelas, e construção de gráficos.

6.15 Análise estatística

As análises do desenvolvimento embrionário foram realizadas por quadrado, conforme procedimento do software JMP V.16 SAS Institute Inc. Para o RNAseq, as análises foram realizadas utilizando o software R de domínio público e seus pacotes, estes necessários para a geração de dados construção de gráficos e análise funcional dos transcritos. A análise de diferença de expressão gênica foi realizada seguindo as recomendações e a metodologia contida no pacote DESEQ2 (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014) e a análise de ontologia gênica e enriquecimento de vias foi utilizado o pacote ClusterProfiler (YU et al., 2012), ambos do software R. A diferença estatística foi considerada quando $P < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1.1 Caracterização das células endometriais (estromais e epiteliais) por imunofluorescência

Para a caracterização das células estromais foi realizada a imunofluorescência para detecção da presença da proteína vimentina, uma proteína de expressão específica para esse tipo de linhagem celular. Para a marcação foi utilizado um anticorpo anti-vimentina e dois controles negativos de marcação foram utilizados: 1º) um controle negativo para linhagem celular, utilizando células epiteliais incubadas com os anticorpos primário e secundário (Figura 5, imagens A, B e C); e 2º) um controle negativo para a imunofluorescência, utilizando células estromais incubadas somente com o anticorpo secundário (Figura 5, imagens G, H e I). Como pode se observar na imagem abaixo, as células estromais apresentaram a marcação positiva para vimentina (Figura 5 D, E e F). Nas imagens (Figura 5 D, E e F) é possível observar os núcleos das células estromais coradas com Hoescht e o citoplasma das células marcadas em verde demonstrando a presença da proteína (Vimentina). Em contra partida, as células epiteliais não foram marcadas e o mesmo perfil de expressão não é observado e apenas o núcleo celular foi corado com hoestch, (Figura 5 A, B e C). Com esses resultados podemos confirmar que

os cultivos celulares estromais foram isolados e estão purificados corretamente, não apresentando contaminações significativas com células epiteliais.

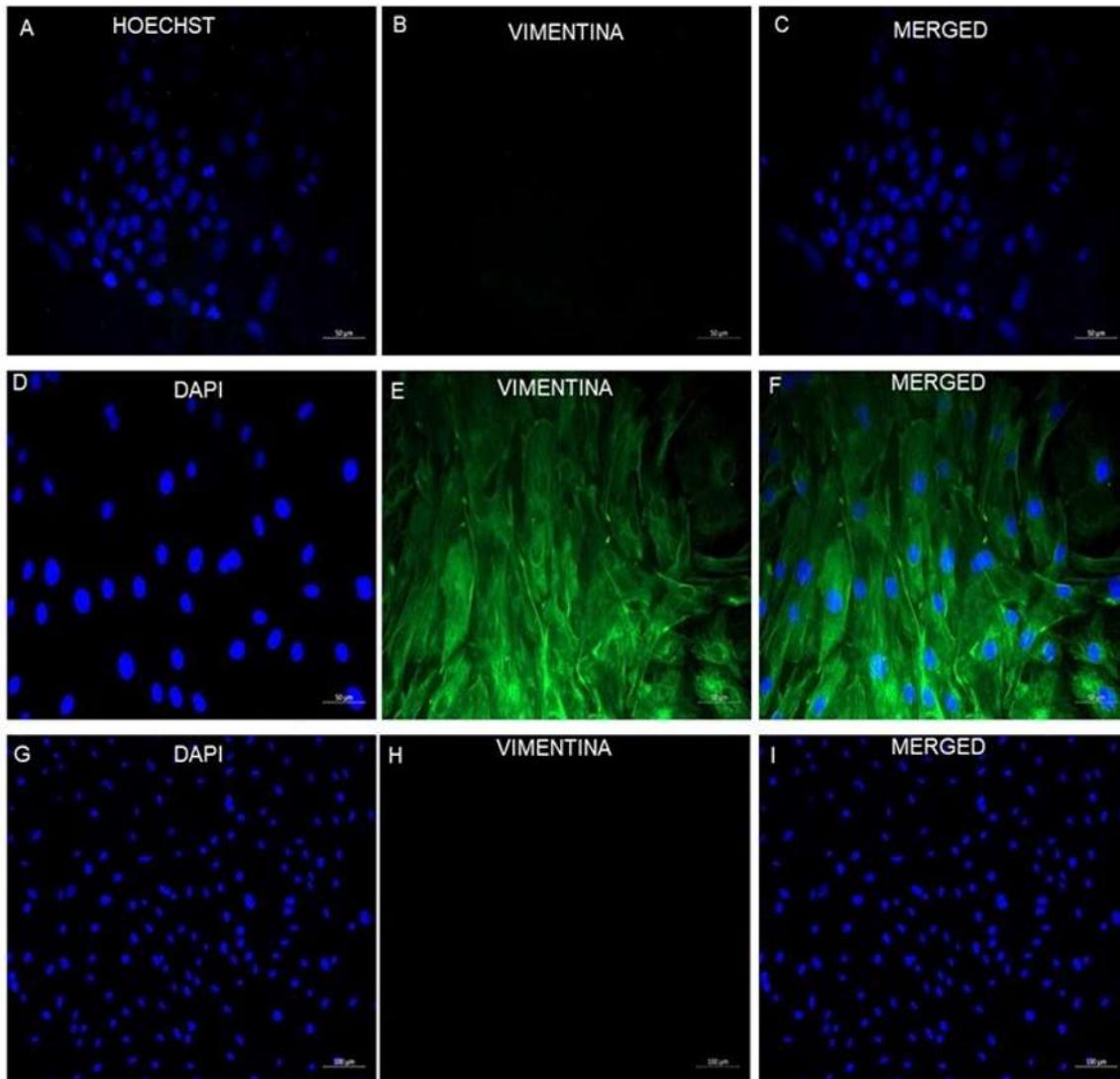


Figura 5. Imunofluorescência das células estromais endometriais cultivadas *in vitro*. As imagens A (hoestch), B (vimentina - FITC) e C (Merge), mostram o controle negativo da linhagem celular para Vimentina (células epiteliais sem marcação). As imagens D (hoestch), E (vimentina - FITC) e F (Merge) mostram células estromais positivas para vimentina. Finalmente, as imagens G (hoestch), H (vimentina - FITC) e I (Merge) mostram o controle negativo da imunofluorescência utilizando células estromais. Todas as imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência em aumento de 10x. Para todos os tratamentos foi utilizado a mesma intensidade (400ms para FITC e 80ms para o hoestch) de exposição a luz ultravioleta (UV). As barras localizadas no canto inferior direito representam 100 µm.

Para a caracterização das células epiteliais também foi realizada a imunofluorescência, porém agora para a detecção de outra proteína (citoqueratina), de expressão específica para esse tipo de linhagem celular. Para a marcação foi utilizado um anticorpo anti-citoqueratina. Como pode se observar

na imagem abaixo, as células epiteliais possuem a marcação positiva para citoqueratina (Figura 6, imagens D, E e F). Em contra partida, as células estromais foram marcadas (Figura 6, imagens A, B e D). Assim como descrito no experimento anterior, também foram utilizados dois controles negativos de marcação: 1º) um controle negativo para linhagem celular, utilizando células estromais incubadas com o anticorpo primário e secundário (Figura 6. A) e 2) células epiteliais incubadas somente com o anticorpo secundário (Figura 6. C). 3) células estromais incubadas com anticorpo primário e secundário.

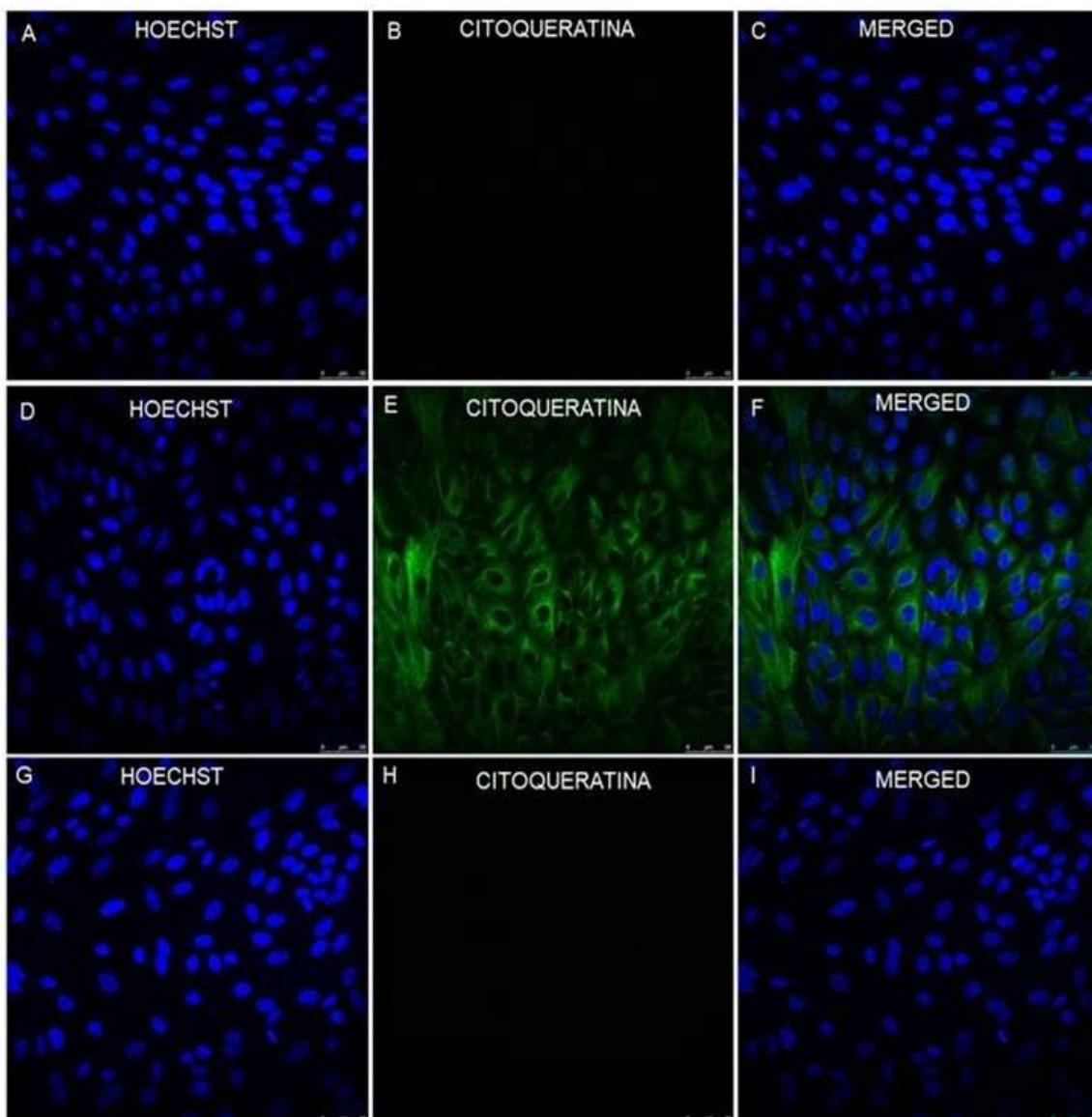


Figura 6. Imunofluorescência das células epiteliais endometriais cultivadas *in vitro*. Imunofluorescência das células epiteliais endometriais cultivadas *in vitro*. As imagens A (hoestch), B (vimentina - FITC) e C (Merge), mostram o controle negativo da linhagem celular para citoqueratina (células estromais sem marcação). As imagens D (hoestch), E (citoqueratina - FITC) e F (Merge) mostram células epiteliais positivas para citoqueratina. Finalmente, as imagens G (hoestch), H (citoqueratina - FITC) e I (Merge) mostram o controle negativo da

imunofluorescência utilizando células epiteliais. Todas as imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência em aumento de 10x. Para todos os tratamentos foi utilizado a mesma intensidade (400ms para o FITC e 80ms para o hoestch) de exposição a luz ultravioleta (UV). As barras localizadas no canto inferior direito representam 100 μ m.

7.1.2 Produção *in vitro* de embrião para isolamento das células do trofotoderma

Para o estabelecimento das células da linhagem do trofotoderma foi realizada a produção *in vitro* de embriões. No total do experimento foram realizadas 30 rotinas de produção, no entanto, apenas 8 rotinas foram selecionadas para o isolamento das trofotoderme. Optamos por fazer esta seleção das rotinas porque para o isolamento, cultivo e manutenção das linhagens da TE é fundamental a utilização de embriões de ótima qualidade, pois embriões de baixa qualidade não aderem corretamente no substrato de matrigel, apresentam um crescimento atrasado e não sobrevivem após o repique celular. Além disso, é importante mencionar que observamos uma variação na produção dos embriões entre as rotinas do experimento. Esta variação encontrada foi principalmente devido a um fator de sazonalidade que ocorre normalmente durante o período do ano (maio até novembro de 2021) em que o experimento de produção *in vitro* de embrião foi iniciado. Desta maneira, apenas as rotinas que obtiveram uma produção de embrião acima de 30% foram utilizadas para isolamento das linhagens do trofotoderma.

No total, 1268 CCOs foram maturados e fertilizados *in vitro*, obtendo uma porcentagem de 73,5% (n=942) de clivagem avaliada no terceiro dia (D3) do desenvolvimento. A média da produção de blastocistos viáveis no sétimo dia (D7) foi de 36,8% (n=474) e a taxa de eclosão dos blastocistos no dia oito (D8) foi de 71,4% (n=337), em relação ao total de blastocistos avaliados em D8. As taxas observadas indicam uma boa qualidade da produção e dos embriões que é fundamental para o isolamento de uma linhagem do TE saudável e que se mantenha estável por longos períodos de cultivo *in vitro*. A Tabela 1 abaixo ilustra as principais rotinas de produção dos embriões FIV que foram utilizadas para o cultivo das linhagens das células do trofotoderma.

Tabela 1. Produção *in vitro* de embriões.

Rotinas	Nº CCOs	Clivagem D3 n (%)	Blastocisto D7 n (%)	Eclosão D8 n (%)
1	276	226 (81,8)	108 (39,1)	80 (74,0)
2	132	99 (75,0)	50 (37,8)	38 (76,0)
3	135	102 (75,5)	41 (30,3)	35 (85,3)
4	150	105 (70,0)	56 (37,3)	30 (53,5)
5	121	86 (71,0)	48 (37,0)	30 (62,5)
6	150	114 (76,0)	65 (43,0)	40 (61,5)
7	118	79 (69,0)	42 (35,5)	34 (80,9)
8	186	131 (70,0)	64 (34,4)	50 (78,1)
Total	1268	942 (73,5)	474 (36,8)	337 (71,4)

Legenda: Os dados de desenvolvimento são referentes a 8 repetições. Complexo *cumulus* oócitos (CCOs) que foram utilizados na maturação *in vitro*. A taxa de clivagem foi avaliada no dia três (D3) e foi realizada sobre o total de CCOs maturados *in vitro*. A produção de blastocisto no dia 7 (D7) também foi realizada sobre o total de CCOs maturados. A taxa de eclosão dos blastocistos foi realizada sobre o total de blastocistos produzidos no D7.

7.1.3 Caracterização morfológica das células do trofotoderma

Os blastocistos eclodidos no D8 foram transferidos para cultivo individual em placas de 24 poços previamente tratadas com uma matriz de colágeno (matrigel) para a adesão dos embriões. Inicialmente testamos um protocolo com concentração baixa de matrigel (0,3 mg/mL). Com esta concentração, observamos que os blastocistos, em sua maioria, não aderiram ao substrato de matrigel (Figura 8) ou se fixavam tardiamente entre os dias doze e quatorze (D12 e D14) do desenvolvimento. Também observamos que os blastocistos que se fixaram tardiamente, após o D12/D14 de cultivo, não se fixavam completamente ou foram se desprendendo do substrato. Além disso, apresentam células mais escurecidas, um sinal claro de células em processo de apoptose, que por fim, acabavam se desprendendo completamente e morrendo. Estes achados podem observado na imagem abaixo (Figura 7).

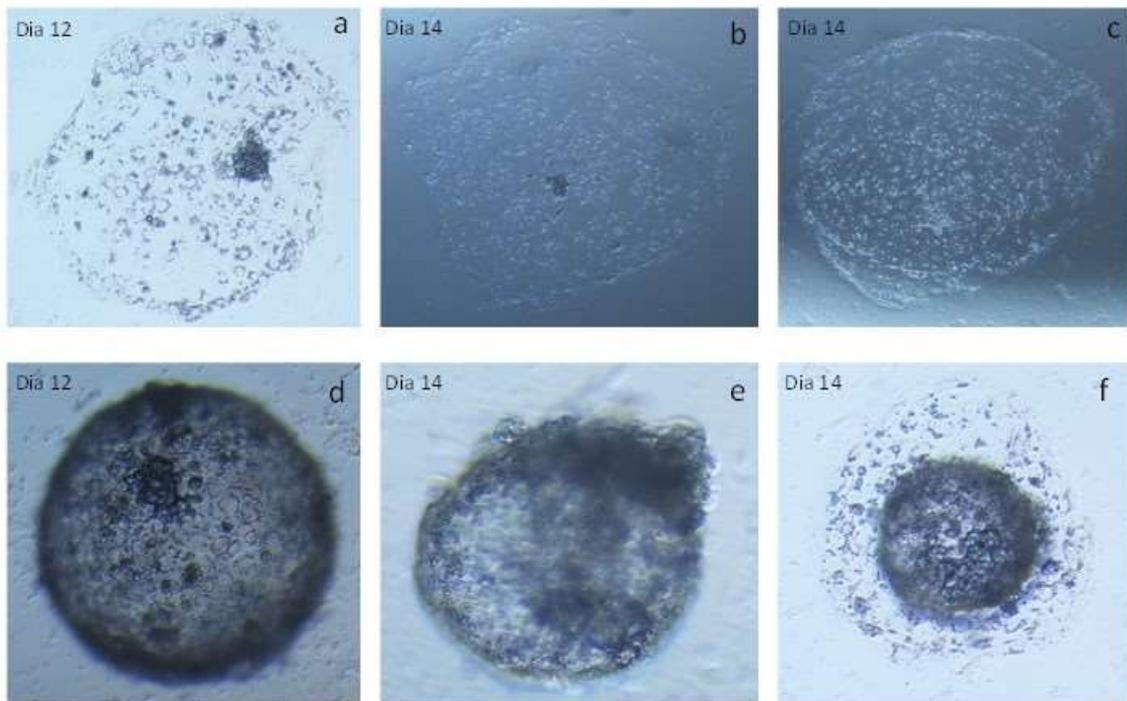


Figura 7. Estabelecimento da linhagem do trofotoderma de blastocistos cultivados individualmente em poços revestidos com matrigel (0,3mg/mL). As imagens (a, b, c) mostram blastocistos que se fixaram, expandiram e apresentaram crescimento das células do trofotoderma, porém, posteriormente com o passar do tempo se desintegraram. As imagens (d, e, f) mostram blastocistos que não se aderiram corretamente no substrato de matrigel ou se fixaram tardiamente, como podem se observar nas imagens. As células escurecidas são um indicativo de sofrimento celular e que estão em processo de apoptose. Todas as imagens foram capturadas em microscopia de luz realizadas em microscópio invertido em aumento de 4x.

Para tentar solucionar o problema de adesão dos blastocistos e melhorar a qualidade das linhagens do trofotoderma isoladas optamos por aumentar a concentração de matrigel para 1 mg/mL, fornecendo desta maneira um substrato mais espesso para adesão dos embriões. Além disso, a melhora na qualidade dos oócitos e conseqüentemente a qualidade dos embriões eclodidos foi crucial para isolar as linhagens saudáveis e capazes de se manter por longos períodos de cultivo *in vitro*. Com essas melhorias conseguimos obter resultados mais satisfatórios com uma maior taxa de adesão dos blastocistos, como mostrado na imagem abaixo (Figura 8). No início do cultivo de células do trofotoderma a taxa de adesão dos blastocistos era de 10% e com o decorrer das rotinas, quando foi possível o cultivo das células do trofotoderma, 85% dos blastocistos aderiam a placa.



Figura 8. Estabelecimento da linhagem do trofocitoma de blastocisto cultivado individualmente em poço revestido com matrigel (1mg/mL). A imagem mostra um blastocisto aderido e considerado com crescimento saudável no D14 do desenvolvimento. No centro da imagem é possível observar um aglomerado celular mais escuro. Esse agregado de células é a massa celular interna do blastocisto. As células do trofocitoma são as células crescendo ao redor em formato circular. A foto foi realizada através de microscopia de luz, utilizado objetivas de 4x.

Com os ajustes do protocolo de cultivo das células do trofocitoma (1mg/mL e utilizando apenas embriões de boa qualidade), foi possível o isolamento e manutenção do trofocitoma *in vitro* das linhagens por longos períodos de tempo, aproximadamente 15 dias, levando no máximo até a 2ª passagem. Aproximadamente 5 dias após a adesão dos blastocistos, foi realizada a passagem celular (Figura 8). A passagem foi realizada com o auxílio

de uma pipeta (1000 μ L), com volume ajustado para 200 μ L, realizando pipetagens mecânicas sucessivas, para que as células do trofocotoderma se dividisse em vários conjuntos celulares menores. do trofocotoderma A partir da segunda passagem foi possível observar o acúmulo de fluido sob a monocamada formando algumas estruturas em forma de cúpula sobre da colônia celular, como podem ser observadas na figura abaixo (Figura 9).



Figura 9. Linhagens de células do trofocotoderma após repique celular (2ª passagem). As imagens mostram linhagem da trofocotoderma de quatro blastocistos cultivados individualmente. A foto foi realizada através de microscopia de luz, utilizado objetivas de 4x.

7.1.4 Caracterização das células do trofocotoderma por imunofluorescência

Em estágios iniciais de desenvolvimento, a expressão de CDX2 na trofocotoderme do blastocisto e na linhagem do trofoblasto durante os estágios pós-implantação pode ser considerada para caracterização da linhagem, além de ser um bom indicador da qualidade embrionária. A caracterização das células do trofocotoderma foi realizada por imunofluorescência para o anticorpo anti-CDX2. É possível observar que células do trofocotoderma apresentaram a

expressão de CDX2 pela co-localização nos núcleos celulares, como pode ser observado na imagem abaixo (Figura 10, A, B e C). Foi utilizado um controle negativo de marcação: 1) células do trofectoderma incubadas somente com o anticorpo secundário. É possível observar que os núcleos celulares não apresentaram a expressão da proteína, como pode ser observado na imagem abaixo (Figura 10 D, E e F).

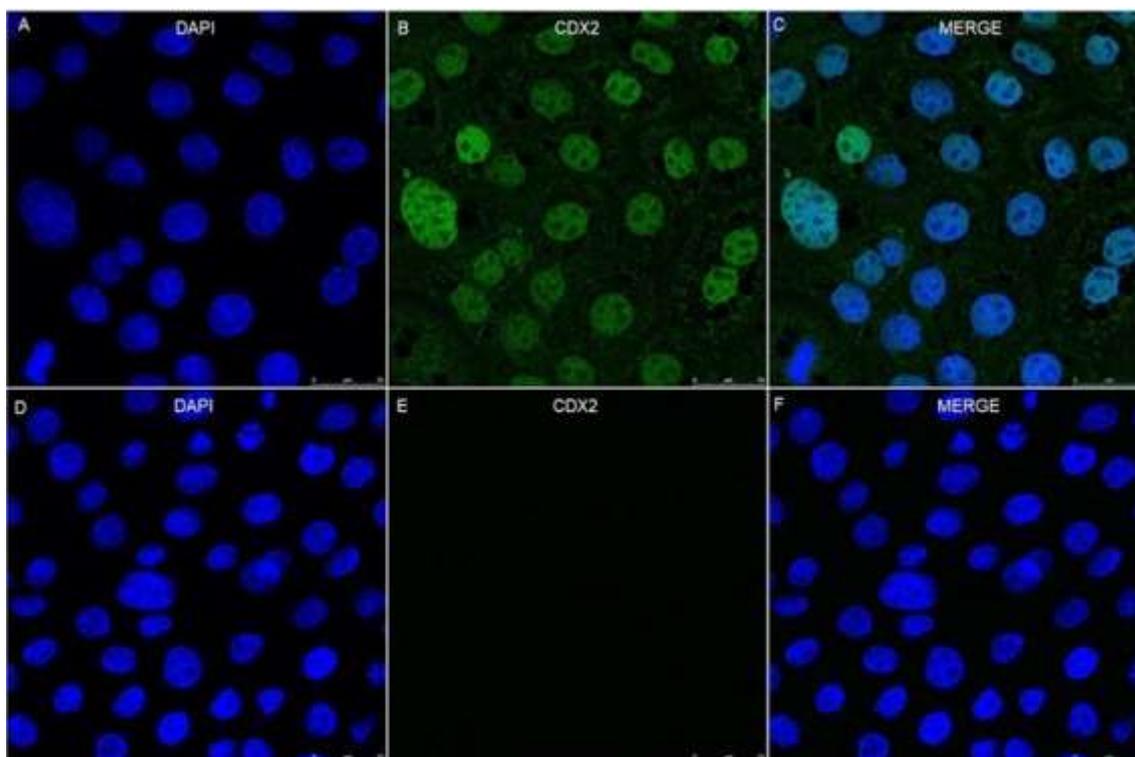


Figura 10. Imunofluorescência das células do trofectoderma cultivadas *in vitro*. As imagens A (Hoescht), B (CDX2 - FITC) e C (Merge) mostram a expressão de CDX2 nas células do trofectoderma. As imagens D do trofectoderma (Hoescht), E (CDX2 - FITC) e F (Merge) mostram controle negativo das células do trofectoderma, não apresentando marcação. Todas as imagens foram capturadas em microscópio de fluorescência em aumento de 40x. Para todos os tratamentos foi utilizado a mesma intensidade (400ms para o FITC e 80ms para o hoescht) de exposição a luz ultravioleta (UV). As barras localizadas no canto inferior direito representam 25 μm .

7.1.5 Contagem de núcleo das células do trofectoderma

Após o cultivo das células do trofectoderma serem estabelecidos, foi realizada uma contagem aproximada da quantidade de núcleo para se estimar a quantidade de células e conseqüentemente a quantidade de VEs produzidas no meio de cultivo dessas células. As células do trofectoderma foram coradas com Hoescht (Figura 11) para marcação do núcleo celular. A contagem de células foi

realizada com blastocistos em cultivo nos dias 12 (n= 4) e 14 (n=4) de desenvolvimento. Inicialmente tentamos realizar a contagem no D16, no entanto o grande tamanho dos embriões impossibilitou a realização da contagem de forma precisa. A média de células consideradas para cada dias foram de n =4 para o D12 e n =4 para o D14, respectivamente. As células da MCI não foram consideradas durante a contagem. As linhagens celulares do trofotoderma podem ser observadas na imagem abaixo (Figura 11).

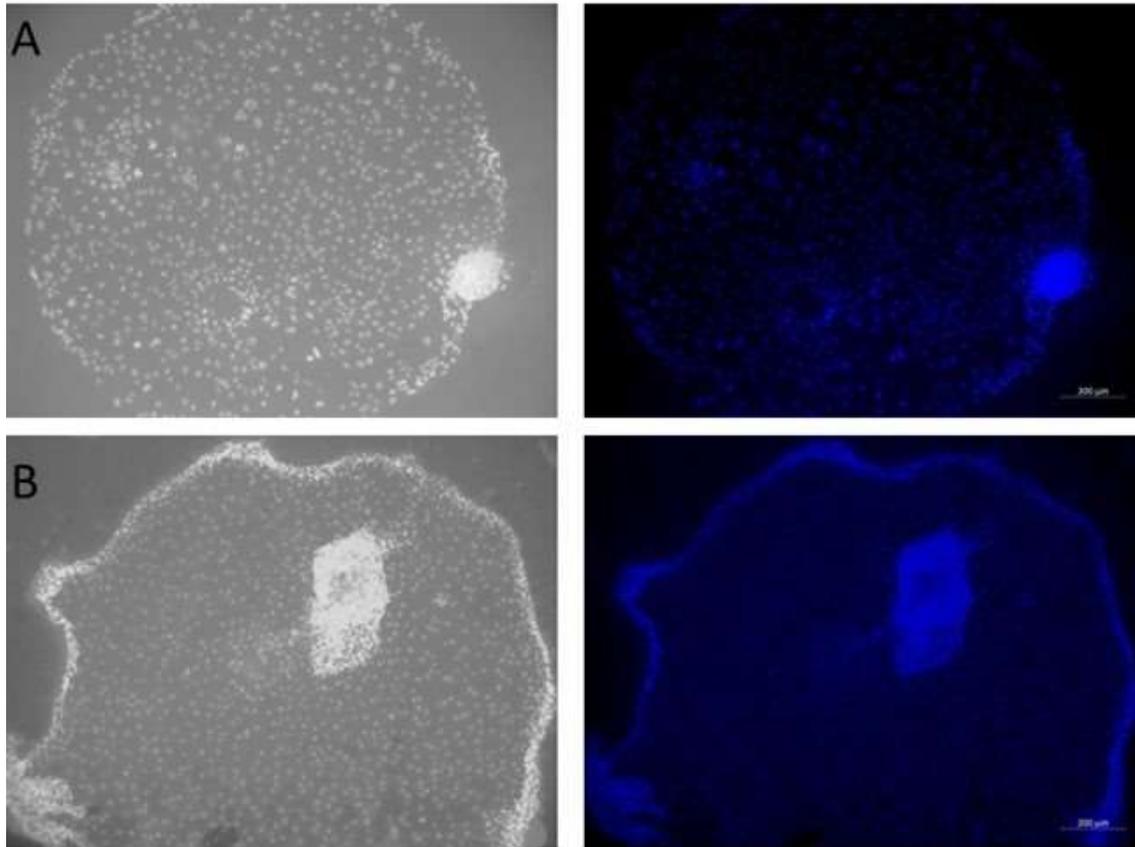


Figura 11. Cultivo de células do trofotoderma derivadas de embriões produzidos *in vitro*. A) A figura mostra o cultivo em D12 de desenvolvimento e a marcação com Hoescht, delimitando o núcleo celular para contagem das células. B) A figura mostra o cultivo em D14 de desenvolvimento e a marcação com Hoescht, delimitando o núcleo celular para contagem das células. As barras localizadas no canto inferior direito representam 200 μm .

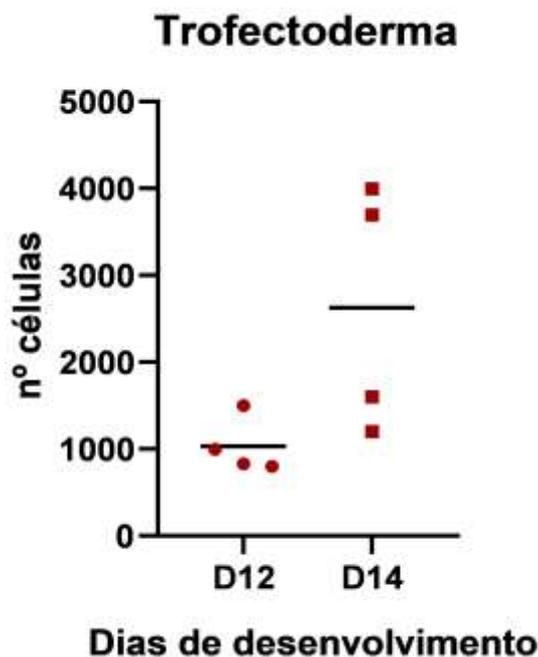


Figura 12. Gráfico de contagem de células do trofectoderma. O gráfico representa no eixo Y o número de células enquanto no eixo X mostra o dia de desenvolvimento do embrião em cultivo. No D12 foram contados em média 1000 células, no D14 foram contadas aproximadamente 3000 células.

7.2 Isolamento e caracterização das Vesículas Extracelulares do meio de cultivo de células endometriais e do trofectoderma

O isolamento das VEs presentes no meio de cultivo das células endometriais e células do trofectoderma foram realizados separadamente, sendo epiteliais e estromais, como citado no tópico 6.2.

7.2.1 Caracterização das VEs isoladas do meio de cultivo de células endometriais por NanoSight

Para a avaliação da concentração e tamanho da VEs das células endometriais foram utilizadas no total cinco ($n = 5$) linhagens epiteliais e cinco ($n=5$) linhagens estromais. Foram avaliados $n = 5$ vídeos de 30 segundos para cada amostra analisada. As partículas avaliadas apresentaram concentração de $6,54E+08 \pm 4,57E+07$ partículas/mL e $8,15E+08 \pm 4,59E+07$ partículas/mL e tamanho de $131,92 \pm 5,52$ nm e $\pm 153,46 \pm 7$ nm e para a células epiteliais e estromais, respectivamente. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) para o tamanho ou

concentração das partículas para as duas linhagens celulares estudadas. Nos gráficos (Figura 13) abaixo é possível observar a distribuição individual de cada amostra, além da média do tamanho e concentração das partículas para cada tipo celular.

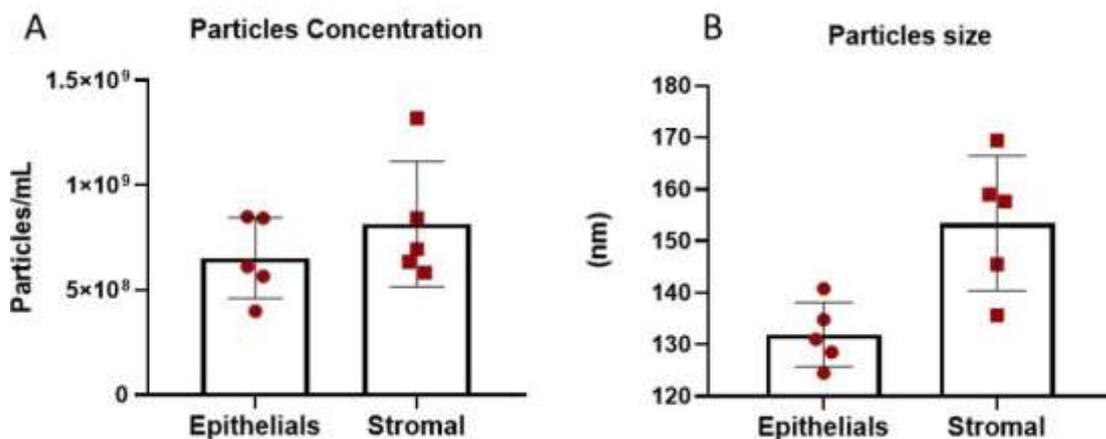


Figura 13. Gráficos representando concentração e tamanho das partículas analisadas no NTA. Os gráficos representam concentração e tamanho das partículas analisadas no NTA. **A)** Gráfico de dispersão com barra mostrando a média (\pm SEM) da concentração partículas produzidas por células epiteliais e estromais, respectivamente. **B)** Gráfico de dispersão com barra mostrando a média (\pm SEM) do tamanho das partículas produzidas por células epiteliais e estromais, respectivamente.

7.2.2 Caracterização das VEs isoladas do meio de cultivo de células do trofectoderma por NanoSight

Para a avaliação da concentração e tamanho da VEs das células do trofectoderma foram avaliadas no total cinco ($n = 5$) linhagens diferentes do trofectoderma. Foram realizados 5 vídeos de 30 segundos em cada amostra analisada. As partículas avaliadas apresentaram concentração de $2,56E+11 \pm 1,61E+10$ partículas/mL e tamanho de $\pm 143,66 \pm 4,60$ nm para as células do trofectoderma. Não houve diferença significativa ($P < 0,05$) para o tamanho ou concentração das partículas para os tipos de células observadas. O tamanho e concentração das partículas para as células do trofectoderma podem ser observadas nos gráficos (Figura 14) abaixo.

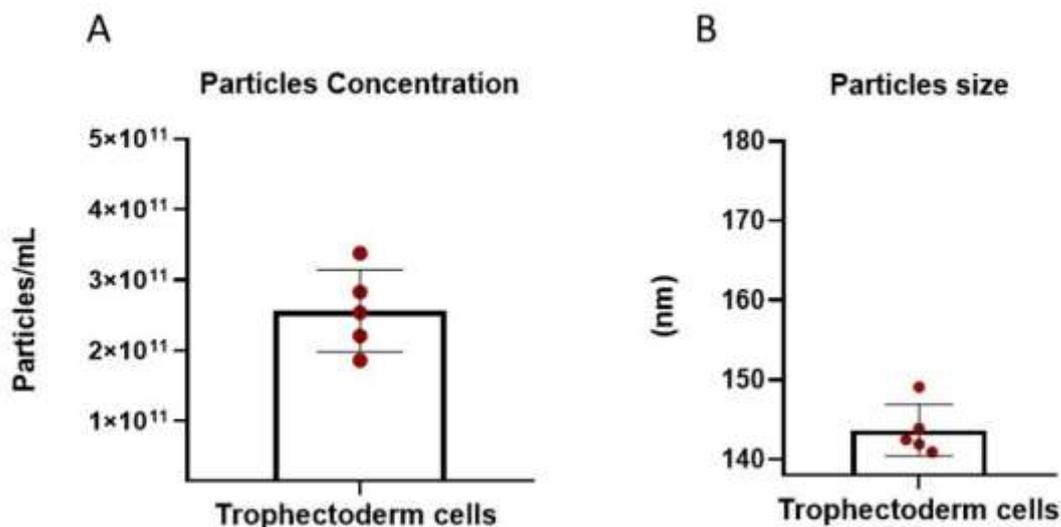


Figura 14. Gráficos representando concentração e tamanho das partículas analisadas no NTA. Os gráficos representam concentração e tamanho das partículas analisadas no NTA. **A)** Gráfico de dispersão com barra mostrando a média (\pm SEM) a concentração das partículas produzidas por células do trofeto derma. **B)** O gráfico de dispersão com barra mostrando a média (\pm SEM) do tamanho das partículas produzidas por células do trofeto derma

7.2.3 Caracterização das VEs isoladas do meio de cultivo de células endometriais e células do trofeto derma por *Western blotting*

As vesículas isoladas do meio de cultivo de células endometriais (epiteliais e estromais) e células do trofeto derma, foram caracterizadas pela presença de proteínas específicas para VEs, ALIX (controle positivo) e para proteínas presentes no retículo endoplasmático (RE) GRP78 (controle negativo). A ALIX é uma proteína presente na membrana de vários tipos celulares. Desta maneira, uma vez que as VEs são originadas a partir da membrana das células também é esperado que as VEs também possuem esta proteína. Em contrapartida, a GRP78 é uma proteína presente no RE, e por tanto, não está presente nas VEs.

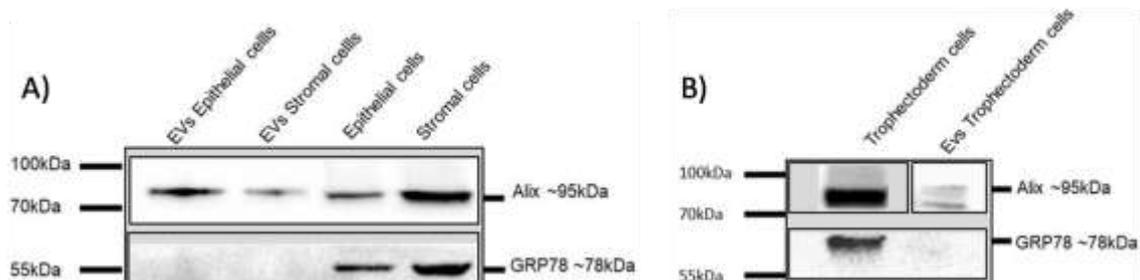


Figura 15. Caracterização das vesículas extracelulares produzidas pelas células cultivadas *in vitro* por Western blotting. A) Identificamos a presença de ALIX, um marcador de VEs presentes no cultivo de células endometriais, sendo demonstrada em células epiteliais e células estromais. Também foi possível detectar a presença de um marcador celular GRP78 somente no lisado celular, confirmando a ausência de contaminação de células no isolamento das VEs produzidas por células endometriais. B) Identificamos a presença de ALIX, um marcador de VEs presentes no cultivo de células do trofoblasto. Também foi possível detectar a presença de um marcador celular GRP78 somente no lisado celular, confirmando a ausência de contaminação de células no isolamento das VEs produzidas por células do trofoblasto.

7.2.4 Caracterização das VEs isoladas do meio de cultivo de células endometriais e do trofoblasto por microscopia eletrônica de transmissão

As VEs isoladas do meio de cultivo das linhagens celulares foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão quanto a morfologia e tamanho. Na imagem abaixo é possível observar que as VEs das três linhagens possuem morfologia e tamanhos compatíveis com VEs. Em todas as imagens é possível observar que as VEs apresentam forma de taça característica de VEs isoladas por ultracentrifugação. Além disso, as VEs das células epiteliais indicadas pelas setas apresentam 57,19 e 125,04nm de tamanho, respectivamente. As VEs das células estromais indicadas pelas setas apresentam 82,39 e 95,96nm de tamanho. A VE das células do trofoblasto apresenta tamanho de 93,97nm.

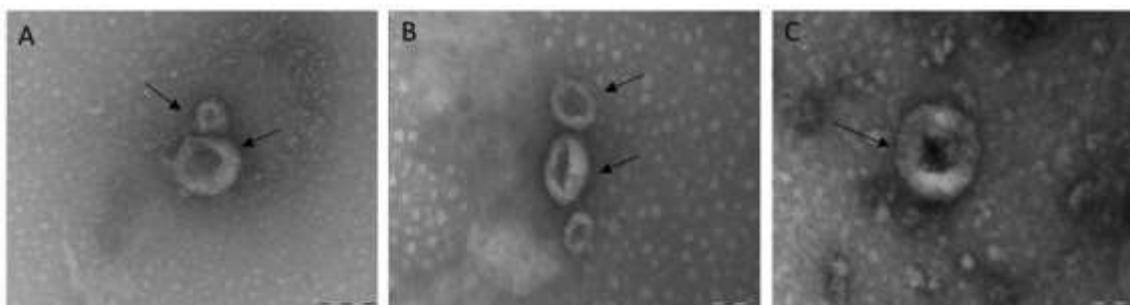


Figura 16. Microscopia eletrônica de transmissão de vesículas extracelulares produzidas por células endometriais e das células do trofoblasto. Os isolados demonstram a presença de

uma população homogênea de pequenas vesículas (A) Vesículas extracelulares produzidas por células epiteliais, a seta indica VEs com diâmetro de 57,19nm e 125,04nm respectivamente (B) Vesículas extracelulares produzidas por células estromais, a barra de a seta indica VEs com diâmetro de 82,39nm e 95,96 nm. (C) Vesículas extracelulares produzidas por células do trofotoderma, a seta indica VEs de diâmetro de de 93,97nm.

7.3 Células endometriais (epiteliais e estromais) absorvem as VEs produzidas pelas células da trofotoderma

As células epiteliais e estromais foram tratadas com VEs isoladas das linhagens do trofotoderma dos embriões FIV. Antes do tratamento as VEs foram marcadas com o corante PKH26 para posterior identificação das VEs nas células epiteliais e estromais. Nas imagens abaixo é possível observar que as VEs do trofotoderma foram absorvidas pelas células epiteliais e uma discreta presença nas células estromais. Adicionalmente, as VEs se acumularam ao redor do núcleo (região perinuclear). Apesar das VEs terem sido absorvidas pelas células epiteliais e estromais é possível observar que as células não absorveram as VEs de forma igual. Desta forma, isto sugere que mesmo células bastante próximas possuem afinidade (potencial de absorção de VEs) diferentes ou que as VEs são absorvidas somente por algumas células, representando uma forma bastante específica e controlada de absorção das VEs.

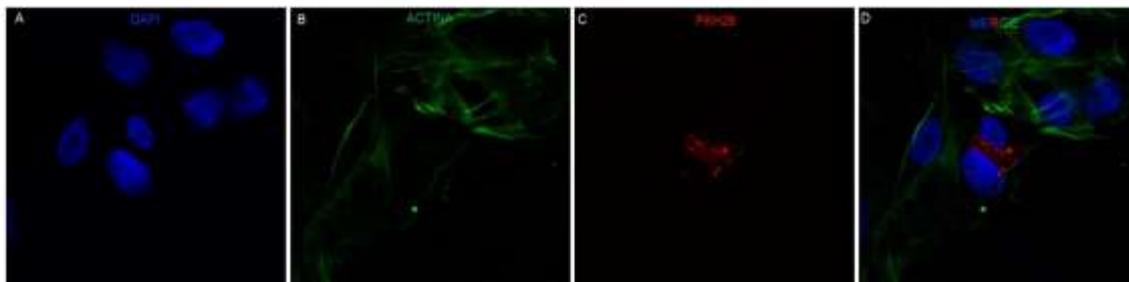


Figura 17. Imunofluorescência das células endometriais (epiteliais) cultivadas *in vitro*. (A,B,C,D) Células epiteliais contendo VEs que apresentaram localização perinuclear. (A) Células epiteliais coradas com Hoescht delimitando o núcleo celular e (B) Actina delimitando o citoplasma das células epiteliais. (C) Vesículas extracelulares isoladas de células da trofotoderme marcadas com PKH26.

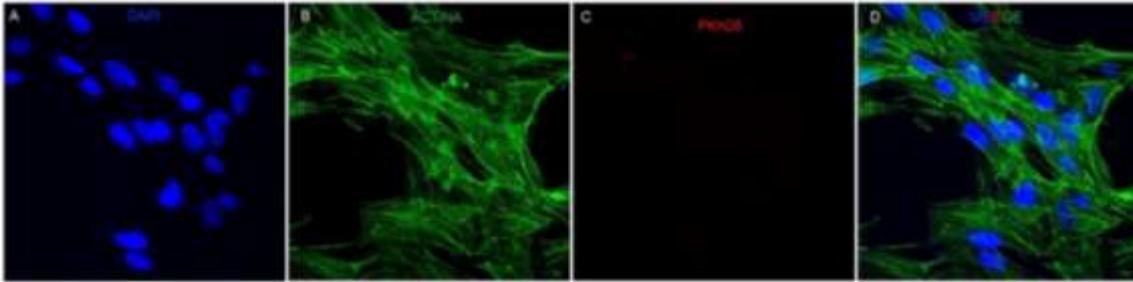


Figura 18. Imunofluorescência das células endometriais (estromais) cultivadas in vitro (A, B, C, D) Células estromais contendo VEs que apresentaram localização perinuclear. (A) Células estromais coradas com Hoescht delimitando o núcleo celular e (B) Actina delimitando o citoplasma das células estromais. (C) Vesículas extracelulares isoladas de células da trofotoderme marcadas com PKH26.

7.3.1 Células do trofotoderma de blastocistos absorvem as VEs produzidas pelas células da epiteliais

As células do trofotoderma (blastocistos) foram tratadas com VEs isoladas das linhagens de células endometriais. Antes do tratamento as VEs foram marcadas com o corante PKH26 para posterior identificação das VEs nas células dos blastocistos cultivados para isolamento das células do trofotoderma. Na imagem abaixo é possível observar que as VEs de células endometriais foram absorvidas pelas células do trofotoderma. Adicionalmente, as VEs se acumularam ao redor do núcleo (região perinuclear). Como nas células endometriais, apesar das VEs terem sido absorvidas pelas células do trofotoderma, é possível observar que as células não absorveram as VEs de forma igual.

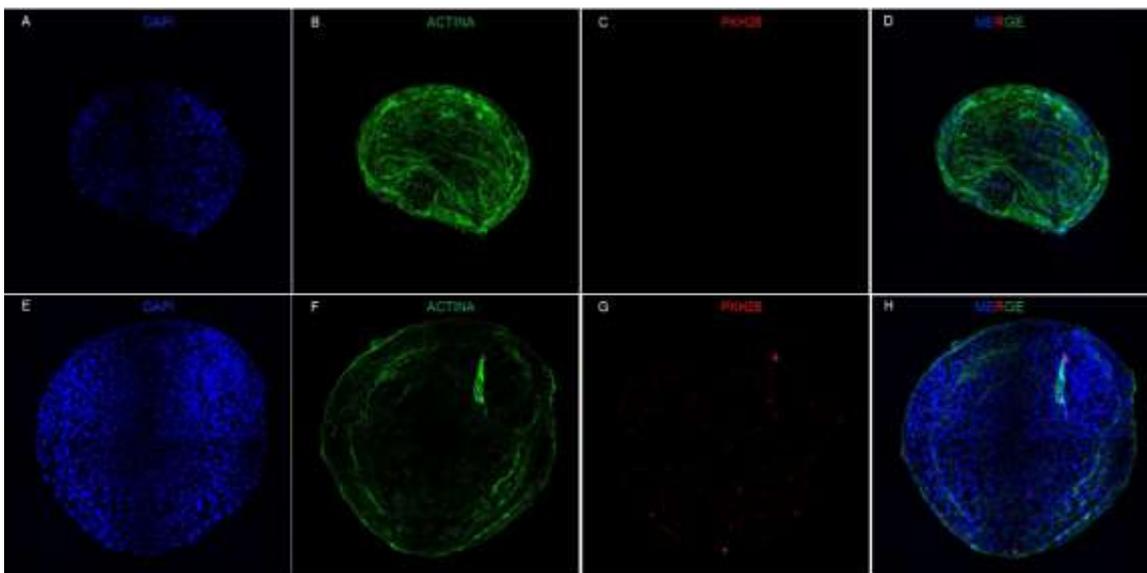


Figura 19.Imunofluorescência das células do trofoblasto de embriões FIV cultivadas *in vitro* (A, B, C, D) Blastocistos em D12 de desenvolvimento, controle, contendo VEs não marcadas com PKH26. (A) Células de blastocistos para cultivo da trofoblasto coradas com Hoescht delimitando o núcleo celular, (B) Actina delimitando o citoplasma das células (C) Nenhuma marcação de VEs presentes nas células de blastocistos para cultivo do trofoblasto. (E, F, G, H) Blastocistos em D12 de desenvolvimento contendo VEs isoladas de células endometriais marcadas com PKH26. (E) Células de blastocistos para cultivo da trofoblasto coradas com Hoescht delimitando o núcleo celular, (F) Actina delimitando o citoplasma das células, (G) Vesículas extracelulares isoladas de células da endometriais marcadas com PKH26.

7.3.2 Perfil de RNAm de células endometriais (epiteliais e estromais) e células do trofoblasto após suplementação com vesículas extracelulares

O perfil de RNAm foi avaliado em células epiteliais, estromais e do trofoblasto após 6 horas de suplementação com VEs apenas com SFB sem VEs. Inicialmente, a análise de componentes principais (*Principal Componente Analysis – PCA*) demonstrou que os grupos de células analisados são distintos de acordo com o tipo celular, explicando a variância (PCA1= 81% e PCA2= 13%). Além disso, as amostras de cada grupo apresentam-se homogêneas de acordo com esta análise. (Figura 20) Já no Heatmap (Figura 21) mostra os valores médios de expressão mRNAs diferencialmente expressos entre as linhagens celulares, controle e suplementadas com VEs.

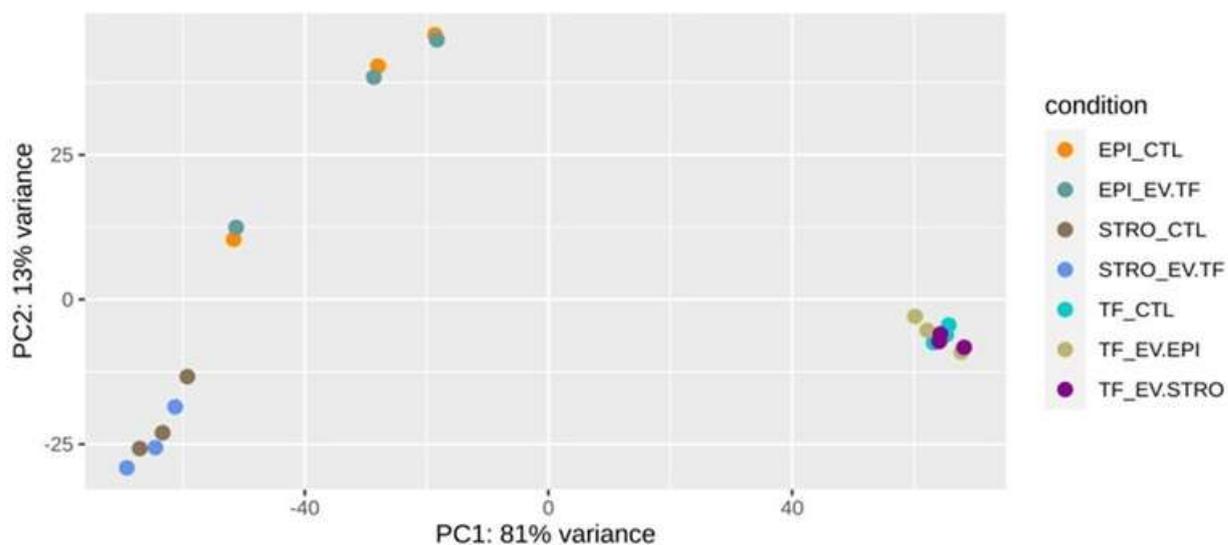


Figura 20. Análise de componentes principais (PCA) dos grupos de células tratadas com VEs e células controle durante 6 horas de tratamento. A figura mostra a dispersão entre cada tipo de linhagem celular.

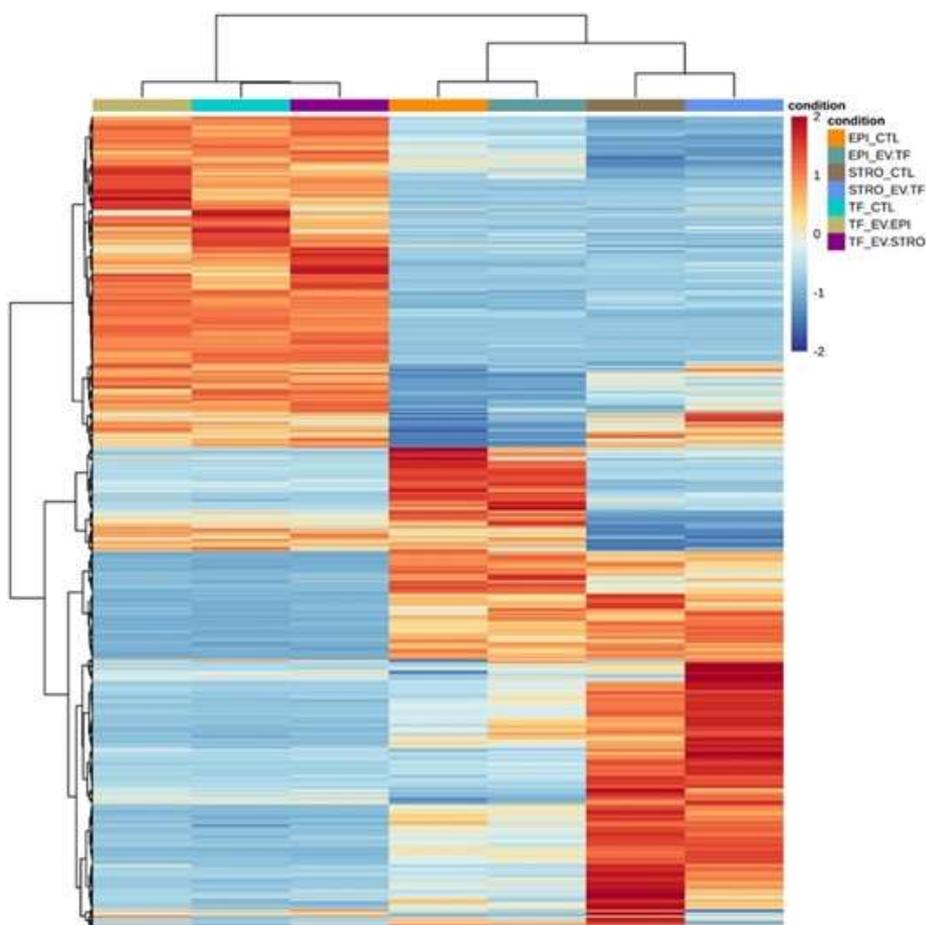


Figura 21. Heatmap representando as variações de genes expressos entre as linhagens celulares tratadas com VEs e controle. Os extremos da cor vermelho indicam a maior expressão do gene, enquanto a cor azul indica uma menor expressão dos genes.

A análise individualizada dos grupos da linhagem epitelial, EPI_CTL vs EPI_EV.TF, gerou uma biblioteca com leitura de $n = 17955$ genes no total. Deste mRNAs identificados, apenas $n = 8$ genes foram considerados diferencialmente expressos e estavam *up-regulated* no grupo EPI_EV.TF em relação ao grupo EPI_CTL (FDR < 0.1). A imagem abaixo mostra o PCA (Figura 22) demonstra as linhagens epiteliais tratadas e não tratadas com VEs isoladas da linhagem do trofectoderma. É possível observar que não houve a perfeita clusretização entre as amostras mostrando que as linhagens do grupo EPI_CTL e do grupo tratado EPI_EV.TF, apesar de possuírem um perfil de expressão de mRNAs diferente, apresentam apenas poucos genes alterados após o tratamento com as VEs. A análise funcional dos DEGs entre os grupos EPI_CTL vs EPI_EV.TF não revelou vias de sinalização relacionadas com estes genes.

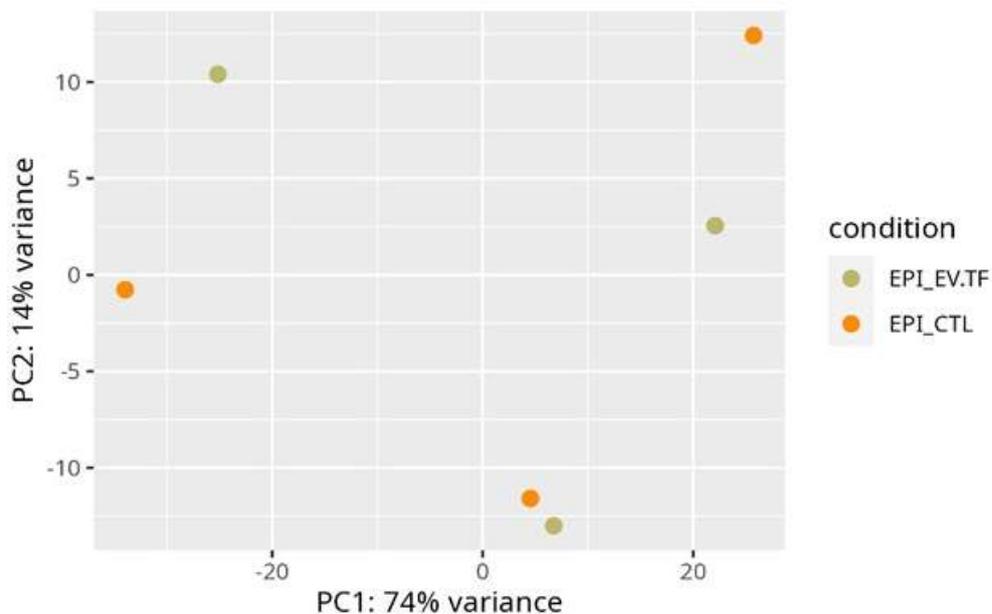


Figura 22. Análise de componente principal (PCA) das células epiteliais tratadas ou não com VEs isoladas da linhagem do trofectoderma. A imagem mostra a dispersão de todas as amostras analisadas, do grupo controle EPI_CTL e do grupo tratado EPI_EV.TF

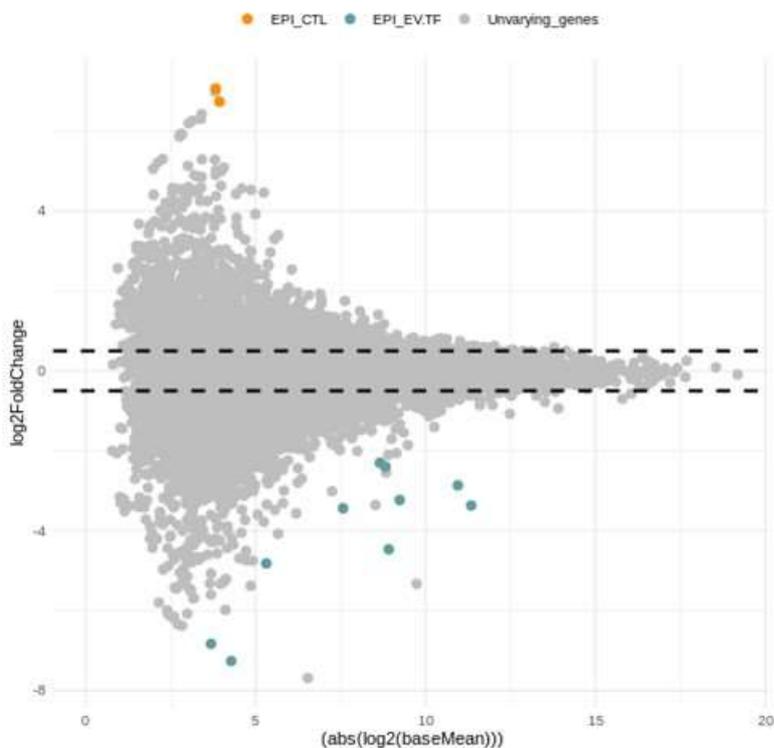


Figura 23. Gráfico vulcão exibindo os resultados de genes diferencialmente expressos (DEG) após a análise de RNA-seq. Os pontos alaranjados indicam os DEGs que foram regulados positivamente no grupo EPI_CTL enquanto os pontos verdes representam os DEGs que foram regulados positivamente no grupo que recebeu a suplementação no meio com VEs de células do trofotoderma EPI_EV.TF.

A análise individualizada das células estromais gerou uma biblioteca com leitura de $n = 17835$ genes no total. Deste mRNAs identificados, $n = 575$ genes foram considerados diferencialmente expressos entre os grupos STRO_CTL vs STRO_EV.TF ($FDR < 0.1$). Entre os genes diferencialmente expressos, $n = 249$ genes estavam *upregulated* no grupo STRO_CTL e $n = 325$ genes estavam *upregulated* no grupo STRO_EV.TF. A imagem abaixo mostra o PCA (Figura 24) apenas das linhagens estromais tratadas ou não com VEs isoladas da linhagem do trofotoderma. É possível observar que houve a clusretização entre as amostras mostrando que as linhagens do grupo controle (STRO_CTL) e do grupo tratado (STRO_EV.TF) possuem um perfil de expressão de mRNAs diferente, possivelmente modulado pelas VEs após o tratamento de 6 horas.

A análise funcional dos DEGs ($n = 575$) entre os grupos estudados revelou no total $n = 15$ vias de sinalização relacionadas com estes genes (Figura 26). As vias de sinalização, foram ranqueadas em relação ao valor de significância (NOD-like receptor signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, Focal

adhesion, ECM-receptor interaction, Endocytosis e Phagosome) para a realização do estudo de conexão e networking entre as diferentes vias (Figura 27).

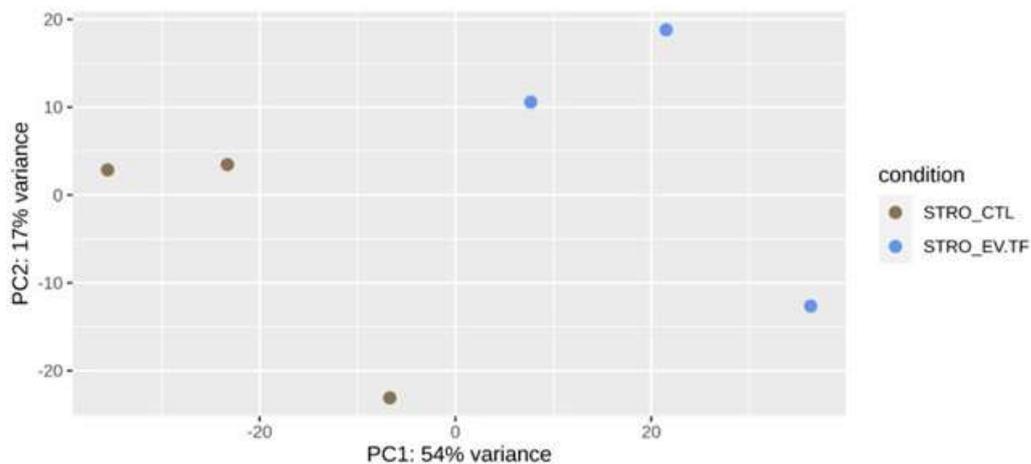


Figura 24. Análise de componente principal (PCA) das células estromais tratadas ou não com VEs isoladas da linhagem do trofotoderma. A imagem mostra a dispersão de todas as amostras analisadas, do grupo controle STRO_CTL (Marrom) e do grupo tratado STRO_EV.TF (Azul).

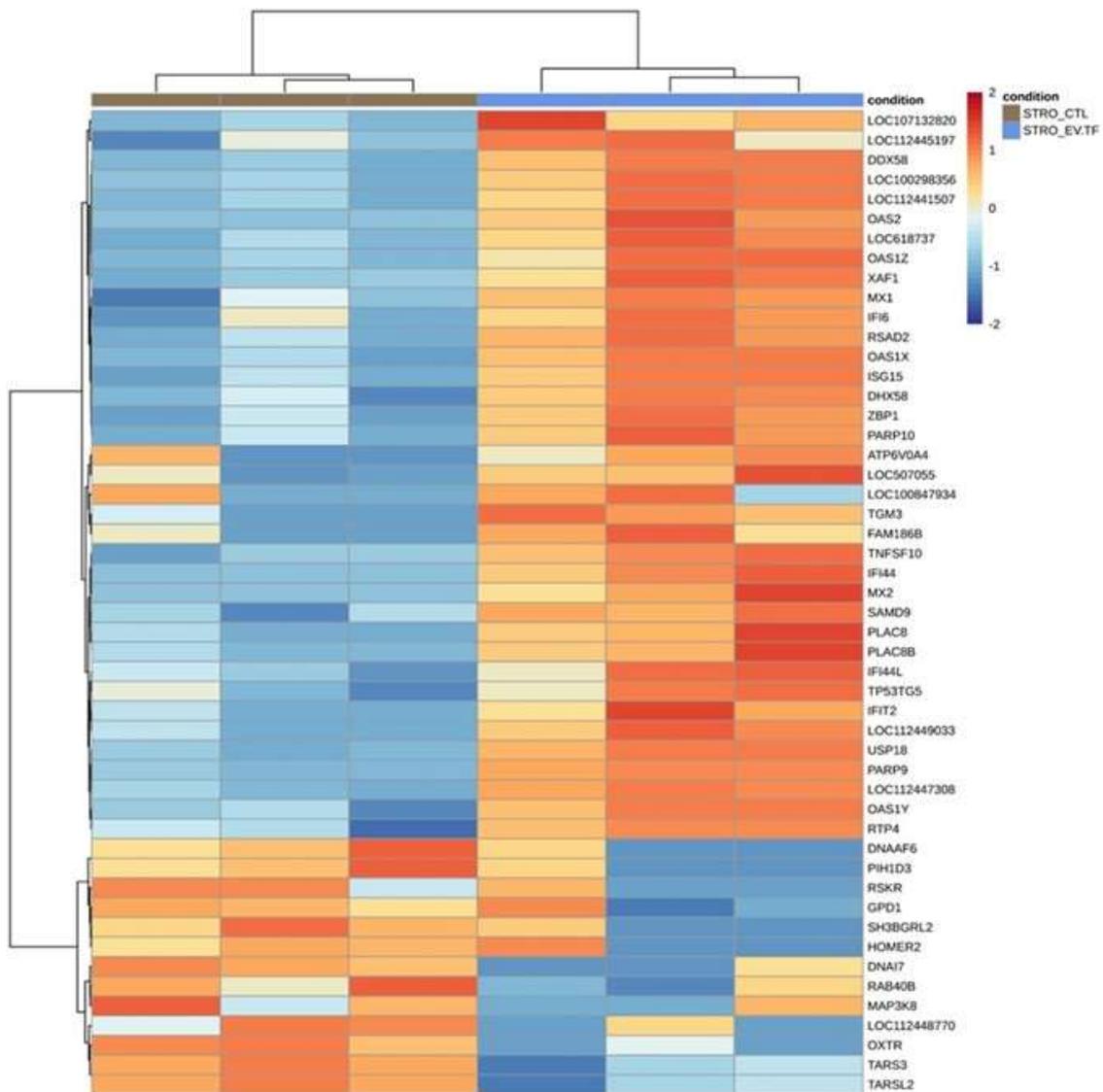


Figura 25. Heatmap representando as variações de genes expressos entre as linhagens celulares tratadas com VEs e controle. Os extremos da cor vermelho indicam a maior expressão do gene, enquanto a cor azul indica uma menor expressão dos genes.

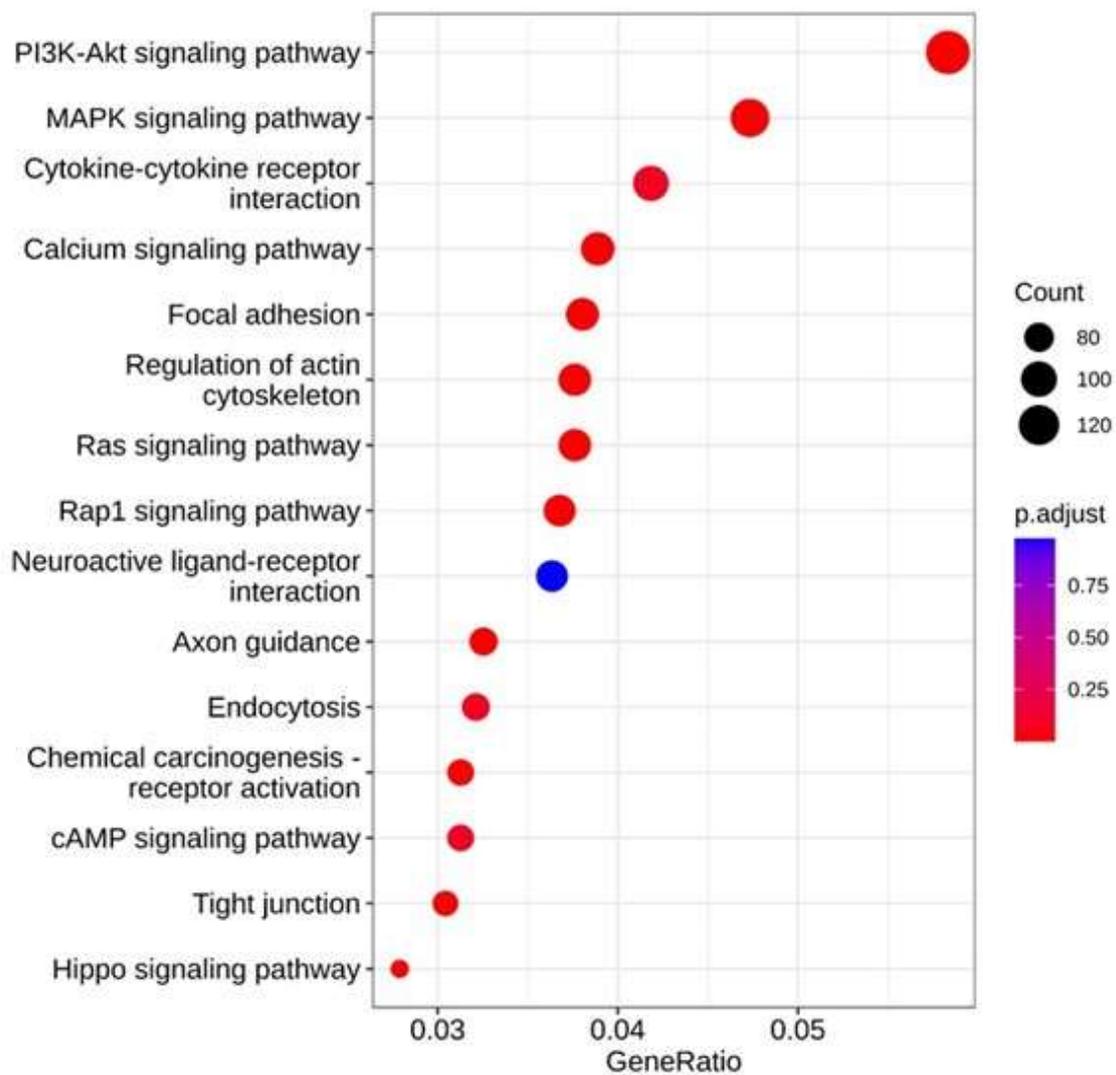


Figura 26. Representação esquemática das vias de sinalização (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG) identificadas a partir da análise funcional dos DEGs entre os grupos STRO_CTL vs STRO_EV.TF. A) As vias de sinalização n = 6 envolvidas com os DEGs ranqueadas pelo valor de significância

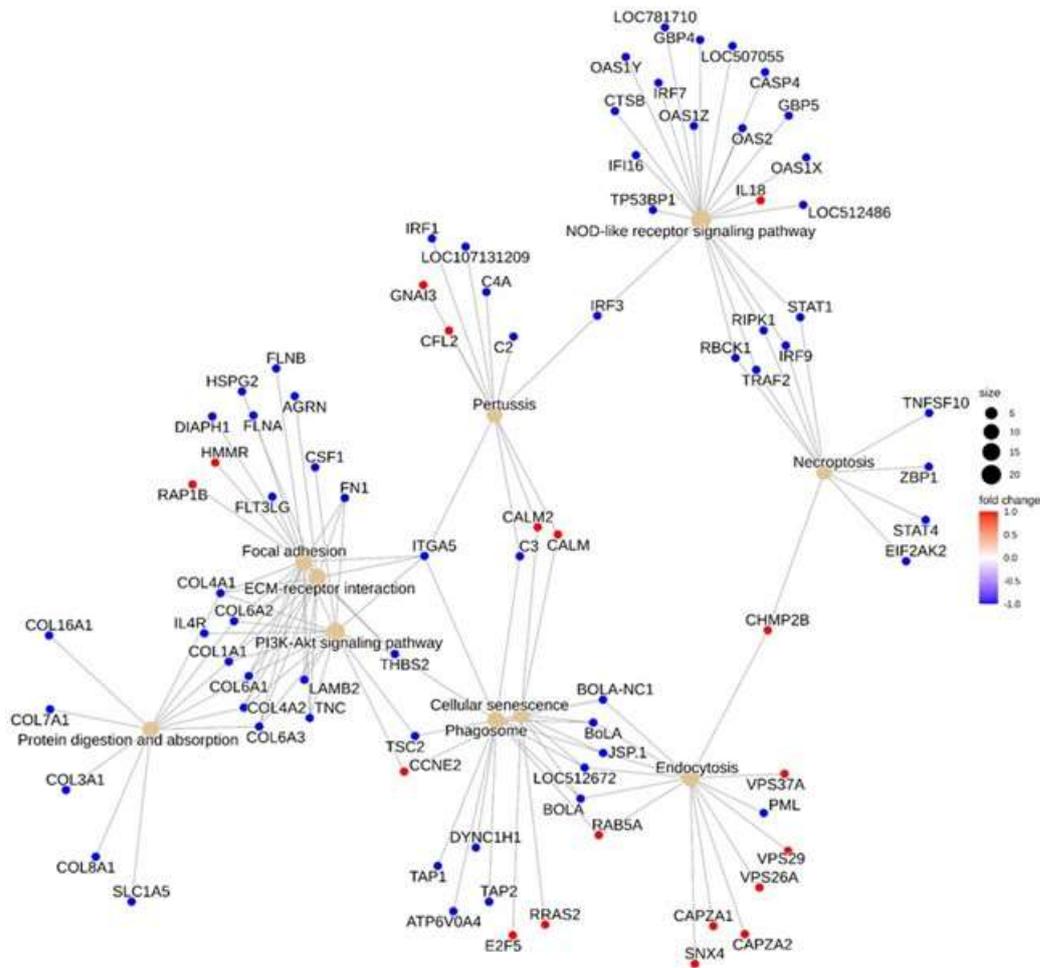


Figura 27. Networking de interação entre as vias e os genes. O networking inclui genes regulados positivamente representados em vermelho e genes regulados negativamente estão representados em azul dos grupos STRO_CTL vs STRO_EV.TF.

A análise entre os grupos da linhagem das trofectoderme, TF_CTL vs TF_EV.EPI, gerou uma biblioteca com leitura de $n = 17955$ genes no total. Deste mRNAs identificados, $n = 8$ genes foram considerados diferencialmente expressos e estavam *up-regulated* no grupo TF_EV.EPI em relação ao grupo TF_CTL (FDR < 0.1). A imagem abaixo mostra o PCA (Figura 28) apenas das linhagens do trofectoderma tratadas ou não com VEs isoladas da linhagem da epitelial. É possível observar que houve a clusretização entre as amostras mostrando que as linhagens do grupo TF_CTL e do grupo tratado TF_EV.EPI possuem um perfil de expressão de mRNAs diferente após o tratamento com as VEs.

A análise funcional dos DEGs entre os grupos TF_CTL vs TF_EV.EPI revelou no total $n = 7$ vias de sinalização relacionadas com estes genes (Figura 29). As vias de sinalização, foram ranqueadas em relação ao valor de significância (PI3K-Akt signaling pathway, Thermogenesis, Chemical carcinogenesis reactive oxygen species, Cytokine-cytokine receptor interaction, Oxidative phosphorylation, retrograde endocannabinoid signaling, Focal Adhesion e JAK-STAT signalling pathway) para a realização do estudo de conexão e networking entre as diferentes vias (Figura 30).

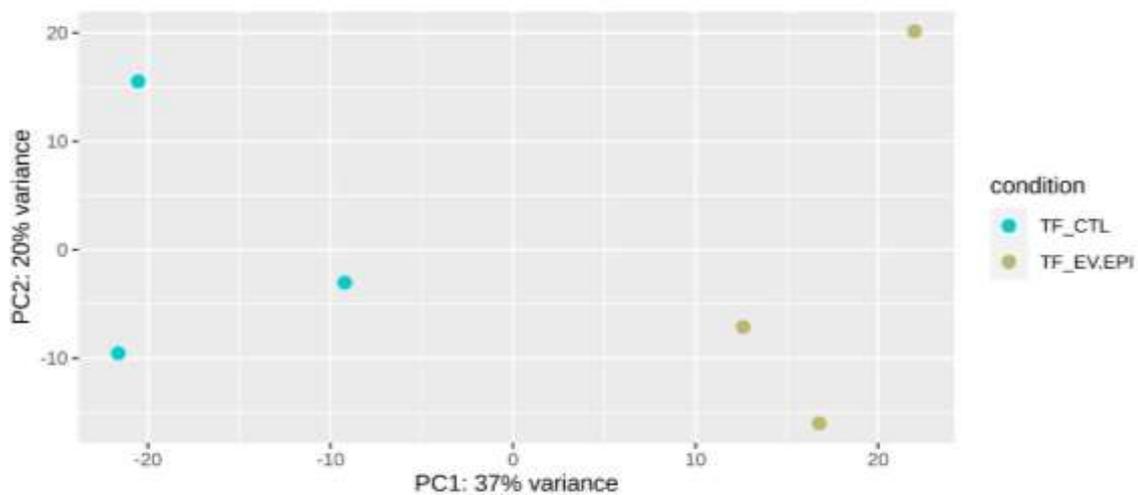


Figura 28. Análise de componente principal (PCA) das células do trofectoderma tratadas ou não com VEs isoladas da linhagem da epitelial. A imagem mostra a dispersão de todas as amostras analisadas, do grupo controle TF_CTL e do grupo tratado TF_EV.EPI

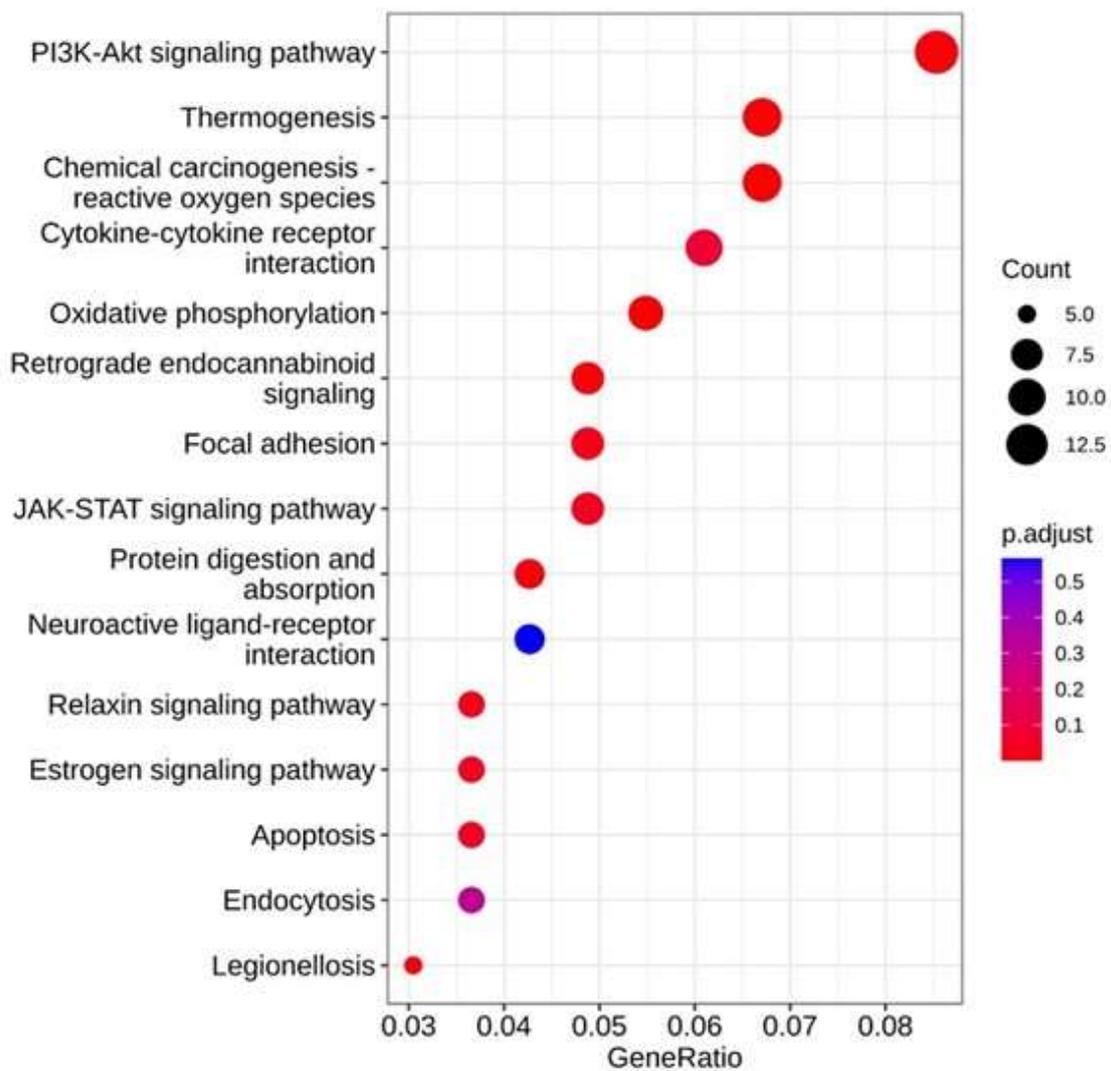


Figura 29. Representação esquemática das vias de sinalização (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes - KEGG) identificadas a partir da análise funcional dos DEGs entre os grupos TF_CTL vs TF_EV.EPI.

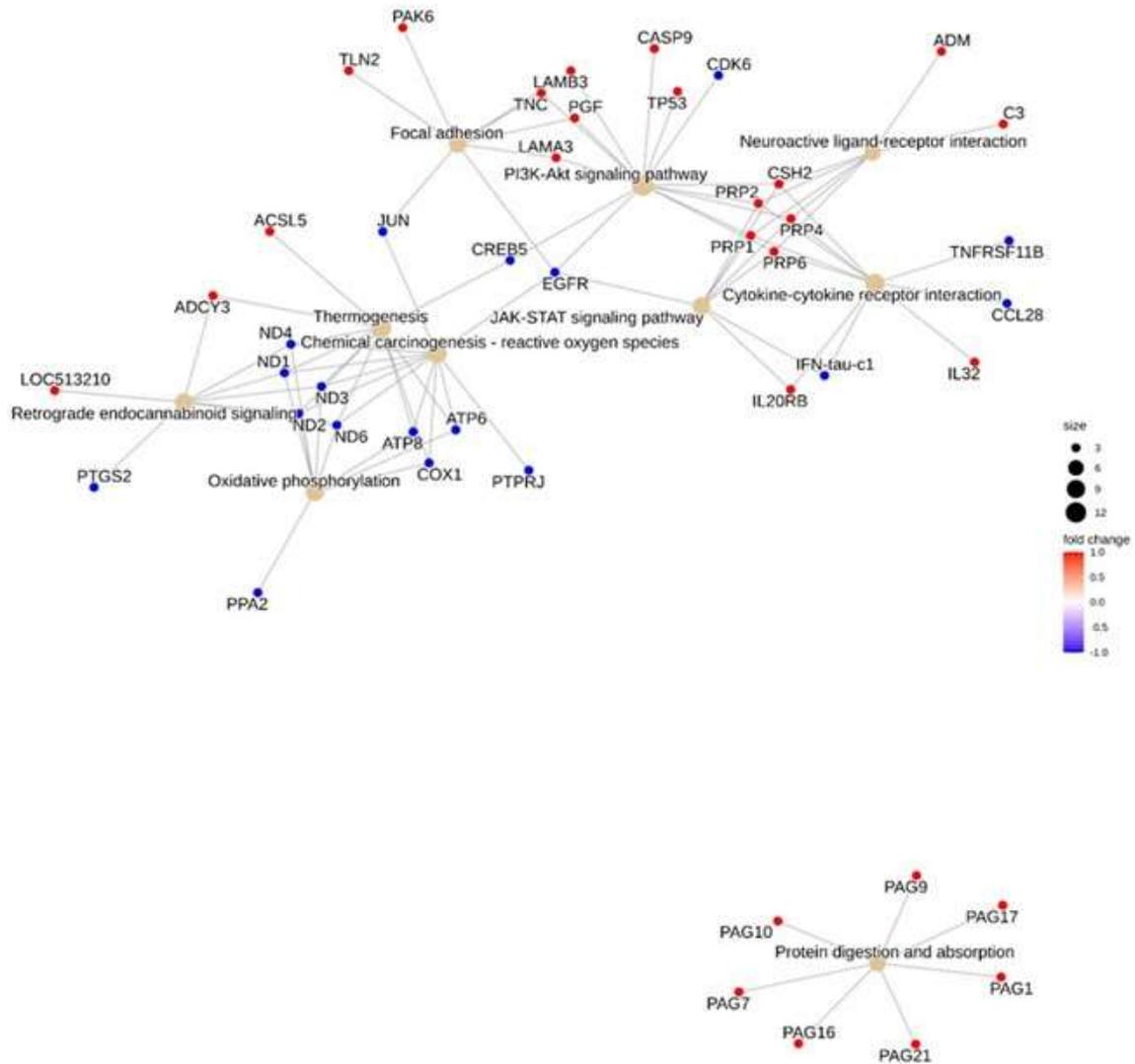


Figura 30. Networking de interação entre as vias e os genes. O networking inclui genes regulados positivamente representados em vermelho e genes regulados negativamente estão representados em azul.

8 DISCUSSÃO

Os principais achados do presente estudo consistem no desenvolvimento de um modelo *in vitro* de comunicação materno-embrionário via VEs obtidas a partir de células de linhagens endometriais e da trofotoderme de embriões FIV. A caracterização das células cultivadas *in vitro*, por meio da imunofluorescência, mostrou serem células que apresentaram marcação para a vimentina, a citoqueratina e CDX2, respectivamente. Estas proteínas são específicas de cada linhagem e são amplamente utilizadas para a caracterização como descrito na literatura. As VEs das células endometriais e das células embrionárias foram

caracterizadas e se mostraram importantes moduladoras da comunicação intercelular no microambiente materno embrionário, podendo alterar a expressão de genes e conseqüentemente, impactar importantes vias biológicas. Assim como a expressão de genes importantes, tais como: IFI44L, ISGs, OAS1, OAS2, KIF1A envolvidos na resposta imune inata à infecção viral. Finalmente, algumas vias de sinalização (ECM-receptor interaction, via de sinalização Cytokine-cytokine e PI3K-Akt), importantes em eventos como na implantação embrionária e de transporte de RNAm, bem como processos biológicos e funções moleculares relacionadas à resposta imune e transcrição. Desta maneira, os resultados obtidos serão discutidos a seguir.

A morfologia das células epiteliais varia desde células colunares altas até células pavimentosas. A sua forma poliédrica deve-se ao fato de as células serem justapostas formando folhetos ou aglomerados tridimensionais, onde se aderem firmemente umas às outras por meio de junções intercelulares (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2017). No presente estudo, podemos observar que as células epiteliais aderidas ao fundo da placa apresentaram crescimento “em ilhas”. Isso ocorre, pois, as células epiteliais crescem mantendo o contato extremamente forte e próximo entre as células o que torna seu crescimento lento e bastante característico deste tipo de linhagem celular. Em contra partida, as células estromais apresentaram característica morfológica mais alongadas e fusiforme, se assemelhando a fibroblastos e com um crescimento *in vitro* mais rápido.

Em um estudo publicado, pesquisadores trabalhando com células endometriais, utilizaram células entre as passagens 8 e 25 para realizar a caracterização das linhagens, que mostrou mudança significativas na morfologia das células em passagens mais avançadas. Além da perceptível mudança na morfologia celular, quando aplicada ao experimento, não houve mudanças significativa na expressão gênica para qualquer uma das passagens testadas (BINELLI et al., 2001). No presente trabalho, também foi observado uma diminuição no crescimento das células epiteliais, quando o cultivo se prolongava por passagens mais avançadas (superior a 5ª passagem), enquanto nas células estromais, não foi perceptível essa diminuição no crescimento quando submetidas a outras passagens. Apesar disso, a morfologia de ambas linhagens cultivadas se permaneceu igual durante as passagens celulares. Em nossos

experimentos não observamos alterações na morfologia e no crescimento celular das linhagens. No entanto, utilizamos as linhagens endometriais em passagens iniciais, até a 5ª passagem, para evitar os possíveis efeitos negativos de um cultivo *in vitro* estendido, como alterações de morfologia, erros de divisão e senescência celular.

As proteínas citoqueratina e vimentina são comumente utilizadas para caracterização de células epiteliais e estromais (WANG et al. 2000, ZEILER et al., 2007, LI et al. 2016) No presente projeto, foi utilizado um número baixo de passagens não havendo uma co-expressão das proteínas utilizadas (citoqueratina e vimentina) como relatado anteriormente por meio de um processo descrito como transição epitélio-mesenquimal (KALLURI e WEINBERG 2009). No entanto, enquanto a vimentina é comumente usada como um marcador geral de células de origem do mesênquima, é frequentemente co-expressa com outros membros da família de filamentos intermediários, como as citoqueratinas, em células cultivadas *in vitro* normais e neoplásicas. JOHNSON et al (1999) e outros, relataram a co-expressão de citoqueratina e vimentina em linhagens de células endometriais glandulares luminiais e glandulares de ovinos em uma passagem precoce (passagem 8). Além disso, também correlacionam que a expressão da vimentina pode estar associada ao envelhecimento das células em cultivo. Um estudo mais recente, revelou que após a primeira passagem de cultivo de células endometriais, mostrou a citoqueratina co-expressa, como um marcador citoplasmático típico de origem epitelial, juntamente com vimentina, marcador de células derivadas do mesênquima (SPHONCHIADO et al., 2020). No presente trabalho, foi observada a forte imunorreatividade para vimentina nas passagens das células de origem estromal. A marcação para vimentina não foi observada nas células epiteliais. Já em células epiteliais, houve uma imunorreatividade para citoqueratina, enquanto que em células estromais, não houve marcação. O presente resultado é sugestivo para a confirmação que o isolamento das células epiteliais e estromais foi efetivo.

Conforme descrito anteriormente, as células da trofectoderme foram estabelecidas a partir de blastocistos produzidos por fertilização *in vitro*. Geralmente, cada linhagem de células da trofectoderme é composta por uma monocamada, em forma de halo, aderida no substrato de matrigel. Esta estrutura

umenta de tamanho (circunferência) com o passar das divisões celulares. Em cultura contínua, um acúmulo de fluido sob a monocamada provocou a formação de uma estrutura em forma de cúpula dentro da colônia. Tais cúpulas continuaram a acumular fluido até que vesículas discretas se formassem. Posteriormente, as vesículas dissociaram-se espontaneamente da colônia e flutuaram livremente no meio por vários dias após a formação. Essas vesículas, livremente flutuantes, de células da trofocodermie se fixaram 24 horas após serem transferidas para uma nova placa (HASHIZUME et al., 2006)

Assim como demonstrado por outros autores, no presente trabalho, todas as células das colônias de trofocodermie foram positivas para CDX2, um fator de transcrição da família *homeobox*. Este gene codifica uma proteína importante na regulação de outros genes específicos, que atuam no desenvolvimento, crescimento e diferenciação de células trofoblasticas (BERG et al., 2011; STRUMPFETAL.,2005).

O método de isolamento de VEs, varia de acordo com o tipo de amostra biológica estudada, além da aplicação, pureza e concentrações de VEs desejadas (LOTVALL et al., 2014; WITWER et al., 2013). Desta forma, o isolamento das VEs presentes no meio de cultivo das células endometriais e embrionárias foram realizados pelo protocolo de ultracentrifugação, de acordo com os métodos utilizados para isolamento e análise de VEs estabelecidos pela “*International Society for Extracellular Vesicles*” (ISEV). Além disso, o protocolo utilizando já é estabelecido e rotineiramente usado em nosso laboratório.

As análises das amostras de VEs após o isolamento podem ser realizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), rastreamento óptico de partículas, citometria de fluxo, *Western blotting* (WB), dentre outras, com objetivo de se avaliar a morfologia, o tamanho, a concentração e o conteúdo proteico (WITWER et al., 2013). Nesse trabalho foram realizadas as análises através de *NanoSight*, WB e TEM para a caracterização das VEs.

As partículas avaliadas nesse trabalho, apresentaram concentração $6,54E+08 \pm 4,57E+07$ partículas/mL e $8,15E+08 \pm 4,59E+07$ partículas/mL e tamanho de $131,92 \pm 5,52$ nm e $153,46 \pm 7$ nm para a células epiteliais e estromais, respectivamente. As partículas avaliadas da linhagem do trofocodermie apresentaram concentração de $2,56E+11 \pm 1,61E+10$ partículas/mL e tamanho de $143,66 \pm 4,60$ nm para a células do trofocodermie e

não houve diferença significativa ($P < 0,05$) para o tamanho ou concentração das partículas para nenhum dos tipos celulares estudados em nosso projeto. A TEM das VEs produzidas por células endometriais e das células da trofocodermia demonstram a presença de uma população homogênea de pequenas vesículas (Figura 14) com diâmetro de 57,19nm e 125,04nm para células epiteliais, com diâmetro de 82,39nm e 95,96 nm para as células estromais, e por fim, com diâmetro de 93,97nm para as células da trofocodermia, confirmando os resultados obtidos no NTA e demonstrando que o protocolo de ultracentrifugação utilizado foi capaz de isolar vesículas pequenas, menores que 150nm de diâmetro.

Em um estudo recente em humanos, utilizando células mesenquimais endometriais a fim de caracterizar as VEs, foi realizada a análise por NTA que permitiu quantificar a distribuição do tamanho e a concentração de partículas com tamanho médio das vesículas isoladas de $\pm 153,5$ nm. A concentração foi de $\pm 3,31 \times 10^{11}$ partículas/ml. (ÁLVAREZ et al., 2018). Outro achado de acordo com os resultados de NTA mostrando perfis de distribuição de tamanho semelhantes para as populações de VEs de células endometriais primárias em humanos, apresentando tamanho entre $143,4 \pm 2,7$ nm e $136,9 \pm 6,9$ nm (média \pm SEM) (MURDICA et al., 2020).

Em geral, as VEs possuem tamanho de acordo com sua biogênese, secreção e tamanho. São subdivididas em exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. Como já descrito anteriormente, os exossomos apresentam um diâmetro de 50-150nm, as microvesículas diâmetro de 100-1000nm e os corpos apoptóticos de 100-5000nm de diâmetro (NAKAMURA et al., 2020). Ainda na literatura, não encontramos, especificamente o isolamento de vesículas de células epiteliais e estromais de endométrio e células da trofocodermia de embriões FIV bovinos cultivados *in vitro*.

As partículas isoladas do meio de cultivo de células endometriais (epiteliais e estromais) e células da trofocodermia, foram caracterizadas com proteínas específicas para VEs ALIX (controle positivo) e para proteínas presentes no retículo endoplasmático (RE) GRP78 (controle negativo) por *Western Blotting*. A ALIX é uma proteína presente na membrana de vários tipos celulares e foi identificada em ambos isolados de exossomos. Já a proteína GRP78 não foi presente no enriquecido de exossomos pois é uma proteína

presente no retículo endoplasmático. O GRP78 se mostrou presente somente no isolado de células, utilizados como controle negativo. Confirmando com esse resultado, que não houve a contaminação celular no enriquecido de exossomos isolados dos meios de cultivos das células endometriais e da trofotoderme.

A escolha dos marcadores para a caracterização através do *Western blotting* foi baseada de acordo com trabalhos publicados por SIMPSON et al., 2008, onde explicam que o conteúdo de proteínas encontradas em VEs é semelhante ao da célula de origem, o que indica funções especializadas. Entretanto, não há marcadores específicos para cada subtipo de VEs, apesar de algumas proteínas, como HSP70, Alix, TSG101, clathrin, CD63, CD81 e CD9 serem abundantes em exossomos (MATHIVANAN et al., 2010; TANNETTA et al., 2014). A validação por *Western blotting* por proteínas ALIX e GRP78 imunoprecipitadas com anticorpos anti-ALIX mostram um enriquecimento claro de VEs no meio isolado de células endometriais e da trofotoderme, devido a presença de proteína específica ALIX e ausência de GRP78, uma proteína de origem mitocondrial, presente somente no lisado celular, sugerindo um isolamento adequado das VEs produzidas por células endometriais e da trofotoderme, sem contaminação celular.

Em um estudo, realizado também a caracterização das VEs através de TEM, por sua vez, obtidas do líquido luminal útero de ovelhas cíclicas ou prenhes, revelou vesículas de cerca de 100nm consideradas como exossomos (BURNS et al., 2014). O resultado do presente estudo, obtidos de fluido de células endometriais de diferentes vacas cíclicas, demonstraram que o *pellet* do isolamento possui VEs em formato de taça e tamanho adequado (<150nm) baseado em imagens de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 16).

Após o tratamento das linhagens com as VEs por 6 horas foi realizado a extração de RNAm e o sequenciamento para determinar o perfil transcricional das linhagens celulares estudadas. Nos resultados do sequenciamento podemos observar que as VEs das células da trofotoderme alteram de forma mais ampla o perfil transcricional das células estromais, em contra partida, alteraram de forma mais sutil o perfil transcricional das células epiteliais. Inicialmente, acreditávamos que as VEs produzidas pelos embriões alterariam o perfil transcricional mais amplamente, alterando vários genes e vias nas células epiteliais lumiais. No entanto, o que observamos foi exatamente o oposto. Este

resultado é de certa maneira inesperado, porém, muito interessante do ponto de vista biológico, pois sugerem um “*fine tuning effect*” das VEs da trofotoderme sobre as células epiteliais. Talvez esse efeito possa ser explicado pela absorção específica das VEs da trofotoderme pelas células epiteliais. Como vimos em nosso resultado, onde apenas algumas células epiteliais foram capazes de absorver as VEs. Acreditamos que esse efeito sutil pode ser um mecanismo biológico específico entre essas duas linhagens celulares, que podem ter evoluído para que mesmo um sinal bastante sutil seja capaz de proporcionar modificações e desencadear a comunicação celular entre as duas linhagens. Além disso, sabemos que a produção de interferon-tau pelas células da trofotoderme do concepto e o seu efeito sobre o epitélio luminal é o principal responsável por alterações na transcrição de genes maternos. Sendo assim, acreditamos que as VEs dos embriões podem atuar como um mecanismo mais sutil e complementar durante o reconhecimento materno da gestação em bovinos.

O tratamento com as VEs da trofotoderme nas células estromais também levou a expressão de genes relacionados à resposta imune, como IFI44L, envolvido na resposta de defesa ao vírus, previsto ser localizado no citoplasma. Gene estimulado por interferon tipo I (ISG) que desempenha um papel crítico na atividade antiviral e antibacteriana (JIANG et al., 2021). OAS1, OAS2, genes envolvidos na resposta imune inata à infecção viral (LI, et al., 2020). A suplementação nas células estromais com as VEs da trofotoderme também alterou a via de sinalização NOD-like receptor signaling pathway. Esta via possui algumas proteínas intracelulares que já foram caracterizadas principalmente no contexto da imunidade de mamíferos. Alguns tipos celulares, como macrófagos, células dendríticas, células epiteliais e células linfoides inatas contribuem para a imunidade inata e são equipadas a um conjunto de receptores de reconhecimento de padrões codificados pela linha germinativa (VAN GORP et al., 2014). Em bovinos, sabe-se que o concepto em desenvolvimento libera sinais, principalmente o INFT, que atua diretamente no endométrio alterando a expressão de genes e muitos deles relacionados com o sistema imune (Spencer e Bazer, 2004). Interessantemente, as VEs da trofotoderme estão também afetando esta via importante que atua no reconhecimento imune.

O tratamento das células da trofocotoderme com VEs de células epiteliais, mostrou a expressão de genes importantes, como KIF1A, a proteína codificada por este gene é um membro da família da cinesina e funciona como uma proteína motora anterógrada que transporta organelas membranosas ao longo dos microtúbulos axonais (CHIBA, et al., 2023). Experimentos revelaram que o IFITM3 funciona como um amplificador central da sinalização PI3K (LEE et al., 2020) gene que também foi diferentemente exposto no tratamento das células da trofocotoderme após suplementação com VEs epiteliais quando comparados com o grupo controle. No presente projeto, a via PI3K-Akt também foi alterada, esta via é conhecida por desempenhar um papel fundamental em inúmeras funções celulares, incluindo proliferação, adesão, migração, invasão, metabolismo e sobrevivência, mas na revisão atual, focamos em seu papel na angiogênese (KARAR e MAITY, 2011)

Durante esse período, o embrião passa a expressar vários receptores conhecidos por ativar a via de sinalização PI3K-Akt. A PI3K-Akt1 é amplamente expressa em placentas de camundongas, incluindo trofoblasto e células endoteliais vasculares. A PI3-K está presente em células trofoblásticas em proliferação e diferenciação. Um estudo feito por KAMEI et al., 2002, em células trofoblásticas, sugere que a PI3-K é potencialmente um mediador chave da ação do fator de crescimento. A PI3-K é um regulador conhecido de uma variedade de processos celulares, incluindo organização do citoesqueleto, ciclo celular, sobrevivência celular, diferenciação celular (LI, et al., 2000) e respostas ao oxigênio e sinais oxidativos. Cada um desses processos celulares está proeminentemente envolvido na regulação do desenvolvimento das células trofoblásticas. (ZUNDEL et al., 2000). Camundongas deficientes em PI3KA-kt1 exibem defeitos no desenvolvimento placentário, incluindo diminuição da vascularização, hipotrofia, ausência de células contendo glicogênio e redução da base decidual (YANG et al., 2003).

Outra via que também foi alterada é a via de sinalização Janus quinase (JAK)/transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT) é caracterizada por diversos sistemas reguladores imunológicos envolvendo proliferação celular, sobrevivência e inflamação e tolerância imunológica. O conhecimento das vias de sinalização JAK/STAT e o uso de inibidores de JAK levaram a avanços notáveis no tratamento de muitas doenças imunomediadas na última década

(LIONGUE e WARD, 2013). As STATs ativas podem então se translocar para o núcleo, onde atuam como fatores de transcrição para regular a expressão gênica. Mutações e polimorfismos nos genes *JAK* e *STAT* têm sido associados a várias doenças humanas, o que não é surpreendente, pois um grande número de citocinas e fatores solúveis sinalizam através da via JAK-STAT (CLARK et al., 2014) Diversas vias de sinalização estão relacionadas com o caráter pluripotente de embriões e células tronco embrionárias (SATO et al., 2004; DRAVID et al., 2005). A via Jak-STAT é estimulada pelo LIF, que induz a ativação dos fatores de transcrição STAT3 e STAT1, responsáveis por manter a autor renovação nas células tronco (MATSUDA et al., 1999). Em um estudo RODIG et al., 1998 mostrou que mutações e perda de função em qualquer JAK são embrionariamente letais em camundongos.

A via *ECM-receptor interaction* também foi alterada no estudo em questão. O ECM transmite sinais físicos e químicos para a célula membrana, que por sua vez leva à propagação do sinal e amplificação através de uma matriz complexa de sinais intracelulares (HUBMACHER et al., 2013; INGBER et al., 2006) Essa sinalização foi previamente bem descrita em tecidos especializados e também tem sido estudado em outros tecidos como vasos sanguíneos, células-tronco, epitélio respiratório e tecidos musculoesqueléticos. Atualmente, o estudo em expansão da mecanotransdução está permitindo uma ampla variedade de avanços na reprodução. (RAYA-RIVERA et al., 2014; BROWN E BADYLAK, 2014) Em humanos, alterações na via de sinalização da ECM e/ou em vias relacionadas à MEC são frequentemente relacionados a eventos reprodutivos patológicos, incluindo parto prematuro, incompetência cervical, endometriose, síndrome dos ovários policísticos e neoplasias no trato reprodutivo (JORGE et al., 2014).

Importantes vias de sinalização (proteoglicanos no câncer e interações ECM-receptores) e foi relatado que o bloqueio de interações entre syndecan-4 e fibronectina diminui as adesões focais nas células, levando ao aumento da proliferação celular em tumores. Assim, o syndecan-4 tem um papel fundamental na regulação da adesão, migração e proliferação celular em alguns tumores (HUANG et al., 2001) A proteína trombospondina-1 (THBS1) também foi associada à via de interação ECM-receptor. Essa glicoproteína pode se ligar ao fibrinogênio, fibronectina, laminina, colágeno tipos V e VII e integrinas mediando

as interações entre as células e a MEC. Além disso, THBS1 está envolvido na regulação da angiogênese (BORNSTEIN, 2009)

Em algumas espécies, o mecanismo de invasão do trofoblasto se assemelha a invasão de células tumorais, pois elas secretam de forma ativa, inúmeras enzimas proteolíticas capazes de digerir a matriz extracelular (ECM) do tecido endometrial (BISCHOF et al., 2002). Em alguns ruminantes, foi relatado anteriormente que o alongamento característico do concepto requer interação entre o trofotoderma e o epitélio luminal uterino que causa um mosaico de interações entre integrinas e ECM, que atuam em conjunto para promover a adesão durante a implantação (BURGHARDT et al., 2009; BAZER et al., 2011)

Ainda em ruminantes, precede a ligação do trofotoderma ao epitélio luminal uterino (LE) que leva a um mosaico de interações entre proteínas da matriz extracelular (ECM), que contribuem para a adesão estável durante a implantação e a placentação (BURGHARDT et al., 2009) A via da ECM está diretamente relacionada com processos do contato inicial do embrião com o endométrio materno. Em um trabalho recente em bovinos, os pesquisadores mimetizando o endométrio em um chip *in vitro*, avaliaram alterações de glicose e insulina maternos, sobre os processos de comunicação na fase inicial da gestação e também relataram alterações na via ECM (DE BEM et al., 2021).

Outra via, a via Neuroactive ligand-receptor interaction é constituída por um grupo de genes de neurorreceptores, foi associada com os DEGs. A neurulação é o processo que leva à formação do tubo neural. Ele antecede a formação do sistema nervoso central e inclui o cérebro e a coluna vertebral. Este sistema é o primeiro a iniciar seu desenvolvimento funcionalmente no embrião em desenvolvimento. Juntamente com a retração posterior da linha primitiva, a neurulação progride de uma direção anterior para posterior. Desta maneira, ao longo de um certo período de tempo, o disco embrionário apresenta tanto a linha primitiva posteriormente quanto o sistema neural em desenvolvimento (HYTTEL et al., 2011).

Este resultado é muito interessante, pois linhagem de células do trofotoderma está expressando genes relacionados com a via de desenvolvimento do sistema nervoso central (Neuroactive ligand-receptor interaction). Em um trabalho com ruminantes (*Bos grunniens*), esta via já foi associada durante ao período de implantação (ZI et al., 2018). Porém, não

observamos resultados na literatura associando esta via aos processos de desenvolvimento gestacional inicial em bovinos.

A Cytokine-cytokine receptor interaction, via de sinalização que também foi alterada significativamente, desempenham um papel na saúde e são cruciais durante as respostas imunológicas e inflamatórias na doença em humanos. (TURRIN e SALAMÁN, 2000). A osteopontina se liga diretamente a integrinas específicas e, assim, promove a migração celular trofocitodermica e fixação ao epitélio luminal. Este complexo tem sido proposto para ser importante em promoção da fixação do embrião. As interações do receptor de citocina-citocina envolvidas na implantação (Altmae et al., 2012) e os mRNAs regulados negativamente associados à interação do receptor de citocina-citocina resultaram em falhas repetidas de implantação (Shi et al., 2017). Em células trofocitodermicas de embriões suínos FIV, a proteólise mediada por ubiquitina e a sinalização ErbB foram aberrantemente reguladas em comparação com embriões *in vivo* (ISOM et al., 2013).

Uma análise transcriptômica do endométrio durante o período de implantação do embrião suíno revelou vários DEGs relacionados à via Cytokine-cytokine receptor interaction, incluindo CCR7, CSF1R, CXCR3, IL10RA e IL2RG (LIN et al., 2015). Sua função pode estabelecer uma comunicação correta entre o endométrio e o conceito em desenvolvimento, preparando o útero para implantação. Alguns genes desta família também foram encontrados em um trabalho recente do nosso grupo, quando sequenciou o endométrio materno durante o período de implantação do embrião em bovinos. Nestes resultados detectamos alguns genes que incluem: CCL1, CCR7, CCL11, CXCR6 CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, IL1R2, IL2RB, IL3RA, IL12RB2, IL31RA e IL18RAP (dados ainda não publicados). Com tudo, no presente estudo foi possível criar um modelo *in vitro* para auxiliar na melhor compreensão de vias e genes importantes na comunicação materno-embriônica, possibilitando desta forma, o melhoramento das tecnologias reprodutivas assistidas.

9 CONCLUSÃO

Em geral, podemos concluir que fomos capazes de isolar células epiteliais e estromais do endométrio de vacas em fase lútea inicial e do trofocitoderma de

embriões bovinos produzidos por fertilização *in vitro*. Além disso, também fomos capazes de isolar e caracterizar as VEs produzidas pelos três tipos celulares estudados. O tratamento das linhagens do trofotoderma com as VEs isoladas do meio de cultivo das células endometriais e vice e versa, simulou o “*cross-talk*” materno/embrionário *in vitro*, gerando um modelo *in vitro* até então inédito de estudo da comunicação materno embrionária mediado por VEs.

Adicionalmente, também fomos capazes de mostrar que a suplementação das VEs causou modificações transcricionais nas células endometriais e do trofotoderma dos embriões. Alguns dos genes alterados fazem parte de vias de sinalização importantes como a da via PI3K/Akt, que é fundamental durante o período do desenvolvimento pré-implantação, a via ECM-receptor interaction, que está diretamente relacionada com processos do contato inicial do embrião com o endométrio materno, a via de sinalização Cytokine-cytokine, que é crucial durante as respostas imunológicas e inflamatórias, dentre outras. Além disso, a expressão de vários outros genes importantes como: IFI44L, ISGs, OAS1, OAS2, KIF1A que estão envolvidos na resposta imune inata.

Finalmente, a partir deste estudo, foi possível verificar pela primeira vez o modelo *in vitro* que mimetiza o microambiente de comunicação materno embrionária inicial com a troca de VEs entre células endometriais (epiteliais e estromais) e embrionárias (trofotoderma). Esperamos a partir do grande número de informações geradas por este estudo, utilizar o modelo de VEs de diferentes origens, para esclarecimento dos seus efeitos específicos no ambiente materno e de embriões, aplicando ao sistema de produção *in vitro* como ferramenta para mimetizar o ambiente *in vivo*. Certamente esta é uma ferramenta que poderá ser utilizado como uma nova estratégia para aprimorar o sistema de reprodução assistida em animais e humanos.

10 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

Alminana C, Bauersachs S. Extracellular vesicles in the oviduct: progress, challenges and implications for the reproductive success. **Bioengineering** 2019;6.

Altmae, S., Reimand, J., Hovatta, O., Zhang, P., Kere, J., Laisk, T., ... Salumets, A. (2012). Research resource: Interactome of human embryo implantation: Identification of gene expression pathways, regulation, and integrated regulatory networks. **Molecular Endocrinology**, 26, 203–217. <https://doi.org/10.1210/me.2011-1196>.

Bauersachs, S.; Wolf, E. Transcriptome analyses of bovine, porcine and equine endometrium during the pre-implantation phase. **Animal Reproduction Science**, v. 134, n. 1- 2, p. 84-94, 2012.

Berg, D.K. Ferreiro, C.S. Pearton, D.J. Poços, D.N. Broadhurst, R. Donnison, M. Pfeffer, P.L. (2011) Determinação da linhagem do trofoblasto em bovinos. **Dev. Célula** 20, 244-255.

Burnett LA, Nowak RA. Exosomes mediate embryo and maternal interactions at implantation and during pregnancy. *Front Biosci* 2016;8:79e96.]Kurian NK, Modi D. Extracellular vesicle mediated embryo-endometrial cross talk during implantation and in pregnancy. **J Assist Reprod Genet** 2019;36: 189e98 57

Bridi, A.; Perecin, F.; Silveira, J.C. Vesículas Extracelulares Mediaram Interações Embrião-Maternal Precoce. **Int. J. Mol. ciência** 2020 , 21 , 1163. <https://doi.org/10.3390/ijms21031163>

Chavatte-Palmer, P.; Guillomot, M. Comparative implantation and placentation. **Gynecologic and Obstetric Investigation**, v. 64, n. 3, p. 166-174, 2007.

Chiba, K., Kita, T., Anazawa, Y., & Niwa, S. (2023). Insight into the regulation of axonal transport from the study of KIF1A-associated neurological disorder. **Journal of cell science**, 136(5), jcs260742. <https://doi.org/10.1242/jcs.260742>

Clark JD, Flanagan ME, Telliez JB. Descoberta e desenvolvimento de inibidores de Janus quinase (JAK) para doenças inflamatórias. **J Med Chem.** 2014;57(12):5023–38. doi: [10.1021/jm401490p](https://doi.org/10.1021/jm401490p) .

Dravid G, Ye Z, Hammond H, Chen G, Pyle A, Donovan P, Yu X, Cheng L. Defining the role of Wnt/beta-catenin signaling in the survival proliferation and self renew of human embryonic stem cell. **Stem Cells** 2005; 23:1489-501.

Eckhart L, Sipo W. Differential Loss of OAS Genes Indicates Diversification of Antiviral Immunity in Mammals. **Vaccines** (Basel). 2023 Feb 12;11(2):419. doi: 10.3390/vaccines11020419. PMID: 36851296; PMCID: PMC9964502.

FARIN, C.E.; FARIN, P.W.; PIEDRAHITA, J.A. Developmental of fetuses from *in vitro*-produced and cloned bovine embryos. **Journal of Animal Science, Champaign**, v. 82, supl. E, p. E53-E62, 2004.

Feng X, Wei Z, Tao X, Du Y, Wu J, Yu Y, Yu H, Zhao H. PLAC8 promotes the autophagic activity and improves the growth priority of human trophoblast cells. **FASEB J.** 2021 Mar;35(3):e21351. doi: 10.1096/fj.202002075RR. PMID: 33570788.

GODAKUMARA K, ORD J, LÄTTEKIVI F, DISSANAYAKE K, VIIL J, BOGGAVARAPU NR, FARIDANI OR, JÄÄGER K, VELTHUT-MEIKAS A, JAAKMA Ü, SALUMETS A, FAZELI A. Trophoblast derived extracelular vesicles specifically alter the transcriptome of endometrial cells and may constitute a critical component of embryo-maternal communication. **Reprod Biol Endocrinol.** 2021 Jul 21;19(1):115. doi: 10.1186/s12958-021-00801-5

György, B.; Szabó, T.G.; Pásztói, M.; Pál, Z.; Misják, P.; Aradi, B.; László, V.; Pállinger, É.; Pap, E.; Kittel, Á.; et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: Emerging role of extracellular vesicles. **Cell. Mol. Life Sci.** 2011, 68, 2667–2688.

Homer H, Rice GE, Salomon C. Review: embryo- and endometrium-derived exosomes and their potential role in assisted reproductive treatments/liquid biopsies for endometrial receptivity. **Placenta** 2017;54:89e94

Ji, Xuemei et al. Identificação de vias de suscetibilidade para o papel do cromossomo 15q25. 1 na modificação do risco de câncer de pulmão. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, pág. 3221, 2018.

Karar, J., & Maity, A. (2011). PI3K/AKT/mTOR Pathway in Angiogenesis. **Frontiers in molecular neuroscience**, 4, 51. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2011.00051>

KÖNIG, Horst Erich; LIEBICH, Hans-Georg. **Anatomia dos animais domésticos**. 2011

Lee, J., Robinson, M. E., Ma, N., Artadji, D., Ahmed, M. A., Xiao, G., Sadras, T., Deb, G., Winchester, J., Cosgun, K. N., Geng, H., Chan, L. N., Kume, K., Miettinen, T. P., Zhang, Y., Nix, M. A., Klemm, L., Chen, C. W., Chen, J., Khairnar, V., ... Müschen, M. (2020). IFITM3 functions as a PIP3 scaffold to amplify PI3K signalling in B cells. **Nature**, 588(7838), 491–497. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2884-6>

Li Q, Luo H, Dai FQ, Wang RT, Fan XQ, Luo YY, Deng MS, Wang Y, Long T, Guo W, Xu B, Xu CX, Jin H. SAMD9 Promotes Postoperative Recurrence of Esophageal Squamous Cell Carcinoma by Stimulating MYH9-Mediated GSK3 β / β -Catenin Signaling. **Adv Sci** (Weinh). 2023 Feb 9:e2203573. doi: 10.1002/advs.202203573. Epub ahead of print. PMID: 36757050.

Li, J., Mao, L., Xiao, F., Liao, Z., Yin, J., Li, W., Sun, M., Liu, M., Ji, X., Liu, C., Xue, T., Yang, L., & Zhang, W. (2020). Interferon-stimulated genes inhibit caprine parainfluenza virus type 3 replication in Madin-Darby bovine kidney cells. **Veterinary microbiology**, 241, 108573. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108573>

Liongue, C., & Ward, A. C. (2013). **Evolution of the JAK-STAT pathway**. *JAK-STAT*, 2(1), e22756. <https://doi.org/10.4161/jkst.22756>

Loneragan, P. (1992). **Studies in the in vitro maturation, fertilization and culture of bovine follicular oocytes**. University College Dublin.

MAMO, S.; MEHTA, J. P.; FORDE, N.; MCGETTIGAN, P. ; LONERGAN, P. Conceptus/endometrium crosstalk during maternal recognition of pregnancy in cattle. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 1, p. 1-9, 2012.

Mathivanan, S.; Ji, H.; Simpson, R. J. Exosomes: Extracellular organelles important in intercellular communication. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 10, p. 1907 -1920, 9/10/ 2010. ISSN 1874-3919. Disponível em: <
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1874391910001843> >.

Matsuda T, Nakamura T, Nakao K, Arai T, Katsuki M, Heike T, Yokota T. STAT 3 activation is sufficient to maintain na undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. **J.Europ Mol Biol Org** 1999; 18:4261-269.

MCcracken, J. A.; Schramm, W.; Einer-Jensen, N. The structure of steroids and their diffusion through blood vessel walls in a counter-current system. **Steroids**, v. 43, n. 3, p. 293-303, 1984

Mullen, M. P.; Elia, G.; Hilliard, M.; Parr, M. H.; Diskin, M. G.; Evans, A. C.; Crowe, M. A. Proteomic characterization of histotroph during the preimplantation phase of the estrous cycle in cattle. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 5, p. 3004-3018, 2012.

Palmqvist L, Glover CH, Hsu L, Lu M, Bossen B, Piret JM, Humphries RK; Helgason CD. Correlation of murine embryonic stem cell gene expression profiles with functional measures of pluripotency. **Stem cells** 2005; 23:663-680.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. **J Cell Biol** 2013;200:373e83.

Rodig SJ, Meraz MA, White JM, et al. A interrupção do gene Jak1 demonstra os papéis obrigatórios e não redundantes dos Jaks nas respostas biológicas induzidas por citocinas. **Célula**. 1998;93(3):373–83.

Satterfield, M. C.; Bazer, F. W.; Spencer, T. E. Progesterone regulation of preimplantation conceptus growth and galectin 15 (LGALS15) in the ovine uterus. **Biology of Reproduction**, v. 75, n. 2, p. 289–296, 2006.

Spencer, T. E.; Bazer F. W. Temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1527-1543, 1995.

Spencer, T. E.; Bazer, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13, 2004. Suplemento E4-E13.

Spencer, T. E.; Bazer F. W. temporal and spatial alterations in uterine estrogen receptor and progesterone receptor gene expression during the estrous cycle and early pregnancy in the ewe. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 6, p. 1527-1543, 1995.

Spencer, T. E.; Bazer, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13, 2004. Suplemento E4-E13.

Spencer, T. E.; Becker, W. C.; George, P.; Mirando, M. A.; Ogle, T. F.; Bazer, F. W. Ovine interferon-t regulates expression of endometrial receptors for estrogen and oxytocin but not progesterone. **Biology of Reproduction**, v. 53, n. 3, p. 732-745, 1995.

Spencer, T. E.; Gray, A.; Johnson, G. A.; Taylor, K. M.; Arieh Gertler, A.; Gootwine, E.; Ott, T. L.; Bazer, F. W. Effects of recombinant ovine interferon tau, placental lactogen, and growth hormone on the ovine uterus. **Biology of reproduction**, v. 61, n. 6, p. 1409-1418, 1999.

Spencer T. E.; Johnson, G. A.; Burghardt, R. C.; Bazer, F. W. Progesterone and Placental Hormone Actions on the Uterus: Insights from Domestic Animals. **Biology of Reproduction**, v. 71, n. 1, p. 2-10, 2004.

Spencer, T. E.; Sandra, O.; Wolf, E. Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 165-179, 2008.

Strumpf, D. Mao, C.A. Yamanaka, Y. Ralston, A. Chawengsaksophak, K. Beck, F. Rossant, J. (2005). Cdx2 é necessário para a especificação correta do destino celular e diferenciação do trofoblasto no blastocisto de camundongo. **Desenvolvimento** 132, 2093-2102.

Simon Hyttel-Sorensen, Line C. Sorensen, Joan Riera e Gorm Greisen, "Oximetria de tecido: uma comparação dos valores médios de saturação de tecido regional, reprodutibilidade e faixa dinâmica de quatro instrumentos NIRS no antebraço humano," **Biomed. Optar. Expresso** 2 , 3047-3057 (2011)

Sponchiado, M. et al. O embrião bovino modula a função do endométrio 7 dias após o estro *in vivo*. **Anais da XXX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Foz do Iguaçu**, p. 313, 2016.

Sangalli, Juliano R. et al. Caracterização da histona lisina β-hidroxibutirilação em tecidos bovinos, células e complexos cumulus-oócito. **Reprodução e Desenvolvimento Molecular** , v. 89, n. 9, pág. 375-398, 2022.

Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH. Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. **Nat Med** 2004; 10:55-63.

See More Hashizume, K., Shimada, A., Nakano, H., Takahashi, T. (2006). Sistemas de Cultura de Células Trofoblásticas Bovinas. In: Soares, MJ, Hunt, JS (eds) Placenta e

trofoblasto. **Methods in Molecular Medicine™**, vol 121. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-983-4:177>

Tannetta, D. et al. Extracellular vesicles and reproduction-promotion of successful pregnancy. **Cell Mol Immunol**, v. 11, n. 6, p. 548-563, 11/print 2014. ISSN 1672-7681. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2014.42> >

Thatcher, W. W. et al. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, v. 56, n. 9, p. 1435-1450, 2001

Turrin, N. P., & Plata-Salamán, C. R. (2000). Cytokine-cytokine interactions and the brain. **Brain research bulletin**, 51(1), 3–9. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(99\)00203-8](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(99)00203-8)

Wang YX, Niklasch M, Liu T, Wang Y, Shi B, Yuan W, Baumert TF, Yuan Z, Tong S, Nassal M, Wen YM. Interferon-inducible MX2 is a host restriction factor of hepatitis B virus replication. **J Hepatol**. 2020 May;72(5):865-876. doi: 10.1016/j.jhep.2019.12.009. Epub 2019 Dec 18. PMID: 31863794.

Y. Heyman, Camous, S. J. Fevre, Wided, M; Martal, J. Maintenance of the corpus luteum after uterine transfer of trophoblastic vesicles to cyclic cows and ewes. **J. Reprod. Fert.** (1984) 70, 533-540.

Zundel, C; Schindler, C; Haas-Kogan, D; koong, A; Kaper, F; Chen, E; Gottschalk, A.R; Ryan, E. L. E; Johnson, R.S; Jeffereson, A. B; Stokoe, D; Giacia, A. J. 2000. A perda de PTEN facilita a expressão gênica mediada por HIF-1. **Genes Dev** 14: 391 –396