

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
Dissertação será disponibilizado
somente a partir de 10/05/23.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS -
BOTUCATU/SP

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO INTRAOVARIANA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS E DO MEIO CONDICIONADO EM BOVINOS**

LUCAS MONTEIRO DO CARMO

BOTUCATU – SÃO PAULO

Julho/2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA CAMPUS -
BOTUCATU/SP

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO INTRAOVARIANA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS E DO MEIO CONDICIONADO EM BOVINOS**

LUCAS MONTEIRO DO CARMO

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Animal.

Orientadora: Profa. Dra Eunice Oba

BOTUCATU – SÃO PAULO
Julho/2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Carmo, Lucas Monteiro do.

Avaliação da aplicação intraovariana de células-tronco mesenquimais e do meio condicionado em bovinos / Lucas Monteiro do Carmo. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Eunice Oba

Capes: 50504002

1. Bovino - Doenças. 2. Células-tronco mesenquimais.
3. Insuficiência ovariana primária. 4. Terapia com células.

Palavras-chave: Insuficiência ovariana prematura; Terapia com células; Vacas.

Lucas Monteiro do Carmo

**AVALIAÇÃO DA APLICAÇÃO INTRAOVARIANA DE CÉLULAS-TRONCO
MESENQUIMAIS E DO MEIO CONDICIONADO EM BOVINOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu,
para a defesa.

Banca examinadora

Presidente e orientadora Profa. Dra. Eunice Oba

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, FMVZ- UNESP-
Botucatu/SP.

Profa. Dra. Júlia Gleyci Soares de Carvalho

Departamento de Urologia/EPM/UNIFESP

Prof. Dr. Fábio Morotti

Departamento de Clínicas Veterinárias - UEL

Agradecimentos

A Deus por me conceder o dom da vida e a oportunidade de aprender um pouco todos os dias.

Agradeço a minha família que nunca mediu esforços para me ajudar e me fazer chegar até aqui.

Meu muito obrigado à minha companheira Karina Ellen Florentino, que salvou e ressignificou a minha vida, sem ela eu não estaria aqui.

Agradeço imensamente a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram a conduzir essa pesquisa. Mesmo com tantas dificuldades e incertezas devido à pandemia do covid-19, não faltaram profissionais dedicados e comprometidos com a ciência para que a pesquisa prosseguisse.

Dentre todos os inúmeros professores que me ajudaram nessa caminhada, deixo meu agradecimento especial a minha orientadora Profa. Dra Eunice Oba, que me acolheu desde minha chegada a cidade de Botucatu, me aconselhando e me instruindo sempre com muita sabedoria e zelo.

A empresa Omics® biotecnologia, por ceder sua estrutura e equipe para produção das células-tronco, muito obrigado.

A faculdade de ciências sociais e agrárias de Itapeva – FAIT que cedeu a estrutura e os animais para o desenvolvimento do projeto, um agradecimento especial aos professores Edjalma Rodrigues da Silva Junior e Juliana de Oliveira Bernardo da instituição que viabilizaram essa parceria.

A Empresa Bovigênese® Biotecnologia animal, em especial ao M.V. MSc. Bernardo M. Bayeux pela participação e todo auxílio durante o experimento, muito obrigado.

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - 132310/2019-8 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) - 2019/01093-9 pelo financiamento da pesquisa e concessão das bolsas.

LISTA DE ABREVIATURAS

CTMs - Células-tronco mesenquimais

MC - Meio condicionado

PBS - Tampão fosfato-salino

AMH - Hormônio anti-mulleriano

IOP - Insuficiência ovariana prematura

CTEs - Células-tronco embrionárias

CTAs - Células-tronco adultas

iPSCs - Induced pluripotent stem cells

FSH - Hormônio folículo estimulante

OPU - Ovun pick-up

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

CEUA - Comissão de Ética do Uso de Animais

PPT - Proteína plasmática total

CFA - Contagem de folículos antrais

ECC - Escore de condição corporal

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	2
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Definição e histórico.....	4
2.2 Classificações.....	4
2.3 Células-tronco embrionárias versus células-tronco de origem adulta.....	5
2.4 Utilização e perspectivas para o uso em condições ovarianas.....	5
2.5 Mecanismos de ação das células-tronco sobre os ovários.....	6
2.5.1 Células-tronco e sua capacidade de diferenciação em células ovarianas.	6
2.5.2 Ação parácrina das células-tronco na recuperação de ovários lesionados quimicamente.	7
2.5.3 Neofoliculogênese e reestabelecimento da função ovariana.....	9
2.6 CTMS e seus efeitos imunomodulatórios.	9
2.7 Segurança em relação ao uso clínico das células-tronco.....	10
2.8 Terapia com meio condicionado.....	11
2.8.1 Segurança do meio condicionado.....	12
2.9 Aplicação intraovariana de células-tronco e meio condicionado em bovinos.	12
3 Considerações gerais.....	12
REFERÊNCIAS.....	13
CAPÍTULO 2	19
Células-tronco mesenquimais e meio condicionado intraovariano em bovinos: Uma terapia segura e promissora.....	20
INTRODUÇÃO.....	22
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
Comitê de ética.....	23
Isolamento, expansão e criopreservação de CTMs oriundas de tecido adiposo de bovinos.....	24
Obtenção do MC.....	25
Animais.....	25
Delineamento experimental.....	25
Protocolo para sincronização da onda folicular.....	26

Aplicação intraovariana de meio PBS, MC e CTMs	26
Exame ultrassonográfico	27
Temperatura corporal	27
Colheita de sangue.....	27
Análises hematológicas	28
Concentração de AMH	28
Análise estatística.....	28
RESULTADOS.....	29
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÃO	34
AGRADECIMENTOS	34
REFERÊNCIAS.....	35

REFERÊNCIAS

- [1] Panay N, Fenton A. Premature ovarian failure: a growing concern. *Climacteric* 2008;11:1–3. <https://doi.org/10.1080/13697130701878635>.
- [2] Terraciano P, Garcez T, Ayres L, Durli I, Baggio M, Kuhl CP, et al. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice. *Stem Cells Int* 2014;2014:1–8. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2014/720753>.
- [3] Wang Z, Wang Y, Yang T, Li J, Yang X. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:1–14. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0458-1>.
- [4] Liu T, Li Q, Wang S, Chen C, Zheng J. Transplantation of ovarian granulosa-like cells derived from human induced pluripotent stem cells for the treatment of murine premature ovarian failure. *Mol Med Rep* 2016;13:5053–8. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5191>.
- [5] Manshadi MD, Navid S, Hoshino Y, Daneshi E, Noory P, Abbasi M. The effects of human menstrual blood stem cells-derived granulosa cells on ovarian follicle formation in a rat model of premature ovarian failure. *Microsc Res e Tech* 2018;82:635–42. <https://doi.org/10.1002/jemt.23120>.
- [6] Wang F, Wang L, Yao X, Lai D, Guo L. Human amniotic epithelial cells can differentiate into granulosa cells and restore folliculogenesis in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. *Stem Cell Res Ther* 2013;4. <https://doi.org/10.1186/scrt335>.
- [7] Xiao GY, Cheng CC, Chiang YS, Cheng WTK, Liu IH, Wu SC. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. *Sci Rep* 2016;6:1–12. <https://doi.org/10.1038/srep23120>.
- [8] Fu X, He Y, Wang X, Peng D, Chen X, Li X, et al. Overexpression of miR-21 in stem cells improves ovarian structure and function in rats with chemotherapy-induced ovarian damage by targeting PDCD4 and PTEN to inhibit granulosa cell apoptosis. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:187. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0641-z>.
- [9] Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouny SA, Eldomiaty MA. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: Possible direct and indirect effects. *Tissue Cell* 2016;48:370–82.

- <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.001>.
- [10] Zhang Q, Bu S, Sun J, Xu M, Yao X, He K, et al. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0721-0>.
- [11] Lai D, Wang F, Yao X, Zhang Q, Wu X, Xiang C. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. *J Transl Med* 2015;13:1–13. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0516-y>.
- [12] Badawy A, Sobh M, Ahdy M, Abdelhafez M sayed. Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model. *Int J Womens Health* 2017;9:441–7. <https://doi.org/https://doi.org/10.2147/IJWH.S134074>.
- [13] Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, Brakta S, Hill WD, Ismail N, et al. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reprod Sci* 2018;25:51–63. <https://doi.org/10.1177/1933719117699705>.
- [14] Mohamed SA, Shalaby S, Brakta S, Elam L, Elsharoud A, Al-Hendy A. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells as an infertility treatment for chemotherapy induced premature ovarian insufficiency. *Biomedicines* 2019;7:1–13. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010007>.
- [15] Abd-allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, El-shal AS, Raafat N, Shabrawy SM, et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *J Cytotherapy* 2013;15:64–75. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.08.001>.
- [16] Liu T, Qin W, Huang Y, Zhao Y, Wang J. Induction of eEstrogen-sensitive epithelial cells derived from human-induced pluripotent stem cells to repair ovarian function in a chemotherapy-induced mouse model of premature ovarian failure. *DNA Cell Biol* 2013;32:685–98. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2032>.
- [17] Liu T, Huang Y, Zhang J, Qin W, Chi H, Chen J, et al. Transplantation of human menstrual blood stem cells to treat premature ovarian failure in mouse model. *Stem Cells Dev* 2014;23:1548–57.

<https://doi.org/10.1089/scd.2013.0371>.

- [18] Park H-S, Chugh RM, Elsharoud A, Ulin M, Esfandyari S, Bakir L, et al. Safety and Toxicology Study After Intra-Ovarian Engraftment of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in Chemotherapy Induced Poi Mouse Model. *Fertil Steril* 2020;114:e99–100. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2020.08.303>.
- [19] Wang Y, Han Z, Song Y, Han ZC. Safety of Mesenchymal Stem Cells for Clinical Application. *Stem Cells Int* 2012;2012:1–4. <https://doi.org/10.1155/2012/652034>.
- [20] Ra JC, Shin IS, Kim SH, Kang SK, Kang BC, Lee HY, et al. Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans. *Stem Cells Dev* 2011;20:1297–308. <https://doi.org/10.1089/scd.2010.0466>.
- [21] Kim HO, Choi S, Kim H. Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. *Tissue Eng Regen Med* 2013;10:93–101. <https://doi.org/10.1007/s13770-013-0010-7>.
- [22] Yang D, Wang W, Li L, Peng Y, Chen P, Huang H, et al. The Relative Contribution of Paracrine Effect versus Direct Differentiation on Adipose-Derived Stem Cell Transplantation Mediated Cardiac Repair. *PLoS One* 2013;8:1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059020>.
- [23] Pawitan JA. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/965849>.
- [24] Park H, Chugh RM, Elsharoud A, Ulin M, Esfandyari S, Aboalsoud A, et al. Safety of Intraovarian Injection of Human Mesenchymal Stem Cells in a Premature Ovarian Insufficiency Mouse Model. *Cell Transplant* 2021;30:1–13. <https://doi.org/10.1177/0963689720988502>.
- [25] Malard PF, Peixer MAS, Joao GG, Sena S, Feres LF, Villarroel CL, et al. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. *Nature* 2020:1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64810-x>.
- [26] Mitchell A, Rivas KA, Smith R, Watts AE. Cryopreservation of equine mesenchymal stem cells in 95 % autologous serum and 5 % DMSO does

- not alter post-thaw growth or morphology in vitro compared to fetal bovine serum or allogeneic serum at 20 or 95 % and DMSO at 10 or 5 %. *Stem Cell Res Ther* 2015;6:231. <https://doi.org/10.1186/s13287-015-0230-y>.
- [27] Chaytor JL, Tokarew JM, Wu LK, Leclerc M, Tam RY, Capicciotti CJ, et al. Inhibiting ice recrystallization and optimization of cell viability after cryopreservation. *Glycobiology* 2012;22:123–33. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwr115>.
- [28] Tongu EA de O, Segabinazzi LGTM, Alvarenga ML, Monteiro A, Papa FO, Alvarenga MA. Allogenic mesenchymal stem cell-conditioned medium does not affect sperm parameters and mitigates early endometrial inflammatory responses in mares. *Theriogenology* 2021;169:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021.03.019>.
- [29] Vaden, Shelly L.; Knoll, Joyce S.; Tilley, Larry P.; Smith FW k. *Exames Laboratoriais e Procedimentos Diagnósticos em Cães e Gatos*. 1st ed. São Paulo: Roca; 2013.
- [30] Kruip h.A.M., Boni R, Wurth YA, Roelofsen MWM, Pieterse MC. Use of Ovum Pick-Up for Embryo. *Theriogenology* 1994;42:675–84.
- [31] Martin I, Fujihara CJ, Marques Filho WC, Maziero RRD, Biscarde CEA, Ferreira JCP. Biopsias Luteais Em Vacas Nelore. *Ciência Anim Bras* 2010;11:724–30. <https://doi.org/10.5216/cab.v11i3.7012>.
- [32] Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. EMBRYO PRODUCTION BY OVUM PICK UP FROM LIVE DONORS. *Theriogenology* 2001;55:1341–57.
- [33] Oliveira CE De, Musse G, Coelho HE, Alberto H, Nolasco RM, Barbosa CHG, et al. Alterações macroscópicas e histopatológicas ovarianas em vacas doadoras zebuínas. *Pubvet* 2018;12:1–6. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n4a71.1-6>.
- [34] Romanovsky AA, Almeida MC, Aronoff DM, Ivanov AI, Konsman JP, Steiner AA, et al. Fever and hypothermia in systemic inflammation: recent discoveries and revisions. *Front Biosci* 2005;10:2193. <https://doi.org/10.2741/1690>.
- [35] Chen PJ. Temperature of a Healthy Cow. *Phys Factb* 1998:1. <https://hypertextbook.com/facts/1998/PeiJunChen.shtml> (accessed April 19, 2021).

- [36] Dalanezi FM, García HDM, Ferrazza R de A, de Queiroz CM, Aristizabal VHV, Schmidt EM dos S, et al. Peritonite Após Biópsia De Corpo Lúteo Guiada Por Ultrassonografia Em Vacas Da Raça Holandesa: Relato De Caso. *Enciclopédia Biosf* 2015;11:2349–59.
https://doi.org/10.18677/enciclopedia_biosfera_2015_206.
- [37] Doria RGS, Canola PA, Cardilli DJ, Toniollo GH, Leite FG, Esper CR, et al. Complicações clínicas em vacas nelore doadoras de oócitos decorrentes da aspiração folicular transvaginal guiada por ultra-som. *Ciência Anim Bras* 2008;9:806–10.
<https://doi.org/https://www.revistas.ufg.br/vet/article/view/4943>.
- [38] Weiss DJ, Perman V. Assessment of the hematopoietic system in ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 1992;8:411–28.
[https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30732-5](https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30732-5).
- [39] Meyer DJ, Harvey JW. *Veterinary laboratory medicine : interpretation & diagnosis*. 3rd ed. St. Louis, Mo. : Saunders; 2004.
- [40] Birgel EH, D'Angelino JL, Benesi FJ, Birgel EH. Valores de referência do eritrograma de bovinos da raça Jersey criados no Estado de São Paulo. *Arq Bras Med Vet e Zootec* 2001;53:164–71.
<https://doi.org/10.1590/s0102-09352001000200006>.
- [41] Seipelt G, Ottmann OG, Ganser A, Eder M, Lindemann A, Falk S, et al. In vitro and in vivo effects of recombinant human interleukin-3 on hematopoietic progenitor cells. *Verh Dtsch Ges Pathol* 1990;74:116–9.
- [42] Cui R, Rekasi H, Hepner-Schefczyk M, Fessmann K, Petri RM, Bruderek K, et al. Human mesenchymal stromal/stem cells acquire immunostimulatory capacity upon cross-talk with natural killer cells and might improve the NK cell function of immunocompromised patients. *Stem Cell Res Ther* 2016;7:1–13. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0353-9>.
- [43] Glenn JD, Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells* 2014;6:526–39. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i5.526>.
- [44] Chastant S, Saint-Dizier M. Inflammation: Friend or foe of bovine reproduction? *Anim Reprod* 2019;16:539–47.
<https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR2019-0057>.

- [45] Kilroy GE, Foster SJ, Wu X, Ruiz J, Sherwood S, Heifetz A, et al. Cytokine profile of human adipose-derived stem cells: Expression of angiogenic, hematopoietic, and pro-inflammatory factors. *J Cell Physiol* 2007;212:702–9. <https://doi.org/10.1002/jcp.21068>.
- [46] Ireland JLH, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Themmen APN, Ward F, Lonergan P, et al. Antral follicle count reliably predicts number of morphologically healthy oocytes and follicles in ovaries of young adult cattle. *Biol Reprod* 2008;79:1219–25. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.071670>.
- [47] Ireland JJ, Smith GW, Scheetz D, Jimenez-Krassel F, Folger JK, Ireland JLH, et al. Does size matter in females? An overview of the impact of the high variation in the ovarian reserve on ovarian function and fertility, utility of anti-Müllerian hormone as a diagnostic marker for fertility and causes of variation in the ovarian reserve in . *Reprod Fertil Dev* 2011;23:1–14. <https://doi.org/10.1071/RD10226>.
- [48] Morotti F, Zangirolamo AF, da Silva NC, da Silva CB, Rosa CO, Seneda MM. Antral follicle count in cattle: Advantages, challenges, and controversy. *Anim Reprod* 2017;14:514–20. <https://doi.org/10.21451/1984-3143-AR994>.
- [49] Li J, Mao QX, He JJ, She HQ, Zhang Z, Yin CY. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. *Stem Cell Res Ther* 2017;8:1–11. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0514-5>.