

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

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As pesquisas com células-tronco trouxeram uma nova perspectiva para o tratamento de doenças até então incuráveis ou com prognóstico desfavorável, como Alzheimer, esclerose múltipla, doenças cardíacas, distrofia muscular de Duchenne e Parkinson (REIS et al., 2015). Visto a capacidade dessas células de diferenciação em diversos tipos celulares e uma poderosa ação parácrina, melhorando e remodelando tecidos acometidos pelos mais diversos tipos de injúrias (BYDLOWSKI et al., 2009; LI et al., 2017).

Dentre várias doenças e condições estudadas visando o tratamento com células-tronco, algumas condições ovarianas como a menopausa precoce, também conhecida como insuficiência ovariana prematura (IOP) atingem inúmeras mulheres, levando a grande sofrimento por uma infertilidade precoce (PANAY; FENTON, 2008). Inúmeros trabalhos já foram realizados simulando essa doença ovariana em pequenos animais para testar a eficácia do tratamento com células-tronco e os resultados veem se mostrando animadores: melhora no número de folículos, restabelecimento da função endócrina ovariana e restabelecimento da fertilidade foram alguns dos resultados apontados para o tratamento com diversos tipos de células-tronco (ABD-ALLAH et al., 2013; SUN et al., 2013; WANG et al., 2013a; BADAWY et al., 2017).

Como a maioria dos estudos foram feitos em pequenos animais (TERRACIANO et al., 2014; WANG et al., 2017a; HERRAIZ et al., 2018), outros pesquisadores postularam que a utilização em grandes animais seria de grande valia com o intuito de compreender como as células-tronco poderiam ajudar no tratamento de doenças ovarianas, tanto em mulheres quanto em animais (ZHAO et al., 2019). Existem grandes vantagens na utilização de bovinos para esse tipo de experimento como a facilidade de sincronização do ciclo estral dos animais a partir de protocolos hormonais, possibilitando a escolha do momento da aplicação dentre todos os eventos importantes do ciclo, como emergência de uma onda folicular, desvio folicular, pré-ovulação, ovulação, formação e maturação do corpo lúteo (BARBOSA et al., 2011; DOROTEU; OLIVEIRA; PIVATO, 2015). Outra grande vantagem já descrita, foi a possibilidade de fazer as aplicações de células-tronco intraovariana sem

intervenção cirúrgica, de maneira minimamente invasiva (MALARD et al., 2020).

Um único trabalho até o momento foi realizado para verificar o efeito das células-tronco sobre os índices reprodutivos de vacas que passam por aspiração folicular, demonstrando um efeito benéfico no número de oócitos produzidos. Entretanto em vacas com doença cística ovariana e lesões crônicas nos ovários, não houve melhor desempenho no número de oócitos produzidos (MALARD et al., 2020).

A utilização de meio condicionado de células-tronco é uma terapia celular que vem ganhando espaço devido a sua poderosa ação parácrina proveniente dos fatores de crescimento, anti-apoptótico, estimulantes de angiogênese e citocinas anti-inflamatórias produzidos pelas células-tronco, sendo incorporados a este meio (KIM; CHOI; KIM, 2013; YANG et al., 2013; PAWITAN, 2014). O meio condicionado de células epiteliais amnióticas humanas demonstrou importante capacidade de evitar apoptose e favorecer a angiogênese em ovários lesados por quimioterapias em ratas (ZHANG et al., 2017).

Até o momento a utilização de bovinos não foi referenciada na literatura como um possível modelo para maior compreensão de como as células-tronco poderiam auxiliar no tratamento da IOP em mulheres. O efeito das células-tronco e meio condicionado nos ovários de bovinos ainda é pouco compreendido, gerando inúmeras dúvidas a respeito de suas possíveis ações e utilidades. Para tanto, um primeiro critério precisa ser sanado; a segurança das células-tronco e do próprio meio condicionado das células em aplicações intraovarianas em bovinos. A aplicação das células-tronco e meio condicionado poderiam gerar um processo inflamatório ou alguma desordem reprodutiva em bovinos sadios? Responder essa pergunta é um ponto chave, para que estudos posteriores avaliem a eficiência das células-tronco para tratar casos de infertilidade ou baixa fertilidade em bovinos e até mesmo para que a espécie seja utilizada como modelo experimental para investigar o funcionamento das terapias celulares em IOP e outras afecções ovarianas.

O objetivo desse estudo foi verificar se aplicações intraovarianas de células-tronco mesenquimais e meio condicionado em bovinos são técnicas seguras, não levando os animais a um processo inflamatório patológico.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Definição e histórico

As células-tronco são células imaturas e indiferenciadas com capacidade de se especializar e diferenciar em diversos tipos celulares (SEN; DOLEY; TIMUNG, 2016).

A primeira referência à formação de organismos completos a partir de poucas células foi em 1877, quando foi formulada a teoria de que o óvulo fecundado formaria uma célula totipotente com a capacidade de diferenciação em diversos tecidos e tipos celulares; essa foi uma das primeiras menções do termo célula-tronco (HAECKEL, 1877). Entre 1877 e 1964 houve uma grande discussão no meio científico sobre o que realmente seriam as células-tronco, o termo foi atribuído em alguns momentos as células que hoje conhecemos como células germinativas primordiais, posteriormente a células que dariam origem a diversos tipos celulares do tecido hematopoiético, até chegar a definição mais próxima da atual: células com a capacidade de auto-renovação e diferenciação (RAMALHO-SANTOS; WILLENBRING, 2007).

2.2 Classificações

As células-tronco são classificadas conforme os tipos celulares que podem originar em totipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e onipotentes. As células totipotentes são capazes de originar todos os tipos de tecidos, incluindo anexos embrionários e placenta. As pluripotentes se diferenciam em todos os tecidos com exceção da placenta e anexos embrionários. As multipotentes são células-tronco que dão origem a diversos tipos celulares desde que provenientes de um mesmo folheto embrionário. As oligopotentes em poucos tipos celulares de um mesmo folheto embrionário. As células que sofrem diferenciação em apenas um único tecido, sendo este o tecido ao qual pertencem, são as onipotentes (KALRA; TOMAR, 2014).

As células-tronco podem ser classificadas em células-tronco embrionárias (CTEs), obtida da massa celular interna de embriões e são totipotentes, ou células-tronco de origem adultas (CTAs), oriundas de adipócitos, polpa dentária, ligamento periodontal, tendões, cordão umbilical, pele, placenta, fluido amniótico, membrana sinovial, músculo, sangue

menstrual entre outros tecidos, sendo classificadas como multipotentes. As “induced pluripotent stem cells” (iPSCs) são células obtidas de fibroblastos de camundongos adultos com características pluripotentes devido a introdução de quatro genes indutores de reprogramação celular (LOPES et al., 2014).

2.3 Células-tronco embrionárias versus células-tronco de origem adulta

Como as CTEs são obtidas de embriões, existe uma grande problemática em torno da questão ética envolvendo o uso dessas células, além da possibilidade da formação de células tumorais devido a totipotência das CTEs (BENVENISTY, 2008; BARBOSA et al., 2013; BLUM), problemas que não são ocorrentes nas CTAs.

Dentre as CTAs, as células-tronco mesenquimais (CTM's) acabam tendo destaque, essas células aparentam ter uma grande influência na modulação do sistema imunológico, sendo amplamente utilizadas para estudos clínicos envolvendo o tratamento para doenças como insuficiência cardíaca, doença renal, fistulização de Crohn e após transplantes de órgãos com o intuito de diminuir rejeições (MUMMERY et al., 2014). As CTM's também apresentam auto-regeneração, divisões assimétricas e alta plasticidade, que é a capacidade das mesmas de originar diferentes tipos de células maduras (BYDLOWSKI et al., 2009).

Os transplantes destas células podem ser autólogo, ou seja, as células transplantadas são obtidas do próprio indivíduo ou alogênico, quando essas células são provenientes de um doador. Transplantes autólogos tendem a ser mais bem-sucedidos em relação ao menor número de efeitos colaterais e rejeições das células pelo sistema imune quando comparados aos transplantes alogênicos (MUMMERY et al., 2014).

2.4 Utilização e perspectivas para o uso em condições ovarianas

Doenças como Alzheimer, esclerose múltipla, infarto agudo do miocárdio e Parkinson, são apenas alguns exemplos de doenças que até então tinham prognóstico reservado a mau e com o avanço da terapia com células passaram a ter novas perspectivas de tratamento (MUMMERY et al., 2014; REIS et al., 2015).

O reestabelecimento da função ovariana a partir do tratamento com células-tronco é uma frente de pesquisa que vem ganhando força na última

década, principalmente com o interesse em encontrar uma alternativa de tratamento para IOP, também conhecida como menopausa precoce (SUN et al., 2013; WANG et al., 2013b; LIU et al., 2014). A IOP é uma condição que leva à depleção das reservas foliculares ovarianas precocemente, causada de maneira espontânea ou até por pelo uso de quimioterápicos para o tratamento de câncer. Essa doença traz grande sofrimento para inúmeras mulheres que desejam engravidar e não conseguem, além de inúmeros sintomas como irritabilidade, nervosismo, perda de libido, depressão, falta de concentração, ganho de peso, infecções frequentes, entre outras (PANAY; FENTON, 2008; VUJOVIĆ et al., 2012).

Trabalhos mostraram o restabelecimento da função ovariana com o tratamento de células-tronco em animais de laboratório após lesão com quimioterápicos, simulando uma condição muito similar a IOP (ABD-ALLAH et al., 2013; LIU et al., 2013, 2014; TERRACIANO et al., 2014; LAI et al., 2015; BADAWY et al., 2017; MOHAMED et al., 2018, 2019). Estes mesmo autores relataram o aumento da produção de estrógeno, queda na produção de hormônio folículo estimulante (FSH), aumento nos níveis de AMH, aumento no número de folículos, maior peso dos ovários e gestação de camundongas que foram tratados com células-tronco para recuperação de ovários agredidos por quimioterapia.

2.5 Mecanismos de ação das células-tronco sobre os ovários

Logo abaixo será discutido os três principais mecanismos que estariam relacionados a ação das células-tronco sobre os ovários.

2.5.1 Células-tronco e sua capacidade de diferenciação em células ovarianas.

As células-tronco podem dar origem à células germinativas ou células que constituem a estrutura do folículo, como células da granulosa? Esse é o primeiro questionamento apresentado diante da terapia de células-tronco para o tratamento de IOP, ou outras condições que possam acometer os ovários. As iPSCs humanas, sob determinados processos “*in vitro*”, poderiam se diferenciar em células semelhantes as células da granulosa “ovarian granulosa-like cells” (OGLCs); essas células quando transplantadas em ovários lesionados por quimioterapia, têm a capacidade de aumentar significativamente a expressão

de marcadores de células da granulosa, diminuir o número de folículos atresícos e aumentar o peso ovariano, restaurando a função ovariana (LIU et al., 2016).

Células da granulosa ativas podem ser originadas a partir de células-tronco do sangue menstrual humano e células epiteliais amnióticas humanas, melhorando a foliculogênese e a secreção de estrógeno e progesterona (WANG et al., 2013a; MANSHADI et al., 2018). Células-tronco mesenquimais do cordão umbilical não demonstraram capacidade de diferenciação em folículos, incluindo células cumulus ou oócitos; entretanto, estas foram capazes de diminuir ocorrência de apoptose das células da granulosa e restabelecer a função endócrina ovariana (WANG et al., 2013b).

2.5.2 Ação parácrina das células-tronco na recuperação de ovários lesionados quimicamente.

Foi constatado que células-tronco de diferentes origens têm a capacidade de evitar ou diminuir a apoptose em células da granulosa após injúria química nos ovários (WANG et al., 2013b, 2017a; HERRAIZ et al., 2018;). Os principais mecanismo estão relacionados diretamente com fatores anti-apoptóticos produzidos e secretados pelas células-tronco, como microRNAs que possuem a capacidade de evitar a apoptose em células da granulosa de ovários danificados e evitar a atresia de folículos ovarianos em camundongos, como os miR-146^a, miR-10^a e miR-21 (XIAO et al., 2016; FU et al., 2017).

Fisiologicamente, os ovários produzem inúmeros tipos de microRNAs, desempenhando funções fundamentais para a regulação pós-transcricional de genes envolvidos no desenvolvimento folicular, ovulação e atresia dos folículos que não passam pelo desvio, sendo produzidos principalmente pelas células da granulosa (FIEDLER et al., 2008; GEBREMEDHN et al., 2015). Em bovinos já foram descritos mais de 50 miRNAs, alguns com funções ainda não muito claras, mas com fortes indícios de que são fundamentais para a regulação de diversas vias moleculares importantes relacionadas ao bom funcionamento dos ovários e *status* reprodutivo (HOSSAIN et al., 2009).

Outras moléculas, como CK 8/18, PCNA, TGF- β , GDF9 e BMP15, que também estão envolvidas no processo de anti-apoptose são produzidas pelas

células-tronco, mostrando eficácia para o reestabelecimento da função de ovários lesados por quimioterapia (ELFAYOMY et al., 2016; ZHANG et al., 2017).

Todos esses fatores citados acima, também são produzidos naturalmente por ovários em condições de homeostase. Os CK8/ CK18 são filamentos do citoesqueleto que além de estarem relacionados à estrutura das células dos ovários, atuam no transporte intracelular, comprovadamente fundamentais para resistência a apoptose, tanto de folículos quanto do corpo-lúteo (SINGH et al., 1994; TOWNSON et al., 2010), exercendo também influência no momento periovulatório (LÖFFLER et al., 2000).

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) desempenha importante papel como regulador do ciclo celular, principalmente no crescimento dos folículos (MUSKHELISHVILI; WINGARD; LATENDRESSE, 2005) além de estar relacionado ao reparo e metilação de DNA, remodelação de cromatina e incluso em inúmeras vias metabólicas importantes (MAGA; HÜBSCHER, 2003).

As moléculas TGF- β , GDF9 e BMP15 são todos fatores produzidos naturalmente pelos ovários e pelas células-tronco, são fundamentais a foliculogênese e suas funções estão muito relacionadas ao crescimento ovariano, especialmente na fase pré-antral (LIN et al., 2003). Em uma condição de quebra da homeostase ovariana, é esperado que inúmeros desses fatores sofram desbalanço ou problemas em sua produção, logo, a ação parácrina das células-tronco poderiam suplementar esses fatores, contribuindo para melhora da condição ovariana.

Células-tronco mesequimais de medula óssea e células-tronco de tecido adiposo demonstraram grande potencial na sua ação parácrina, produzindo fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que além de evitar a apoptose e estimular a proliferação de células endoteliais, desempenhou um importante papel na angiogênese na região tecal dos folículos (SHIMIZU et al., 2002; ABD-ALLAH et al., 2013; DAMOUS et al., 2015).

Fica claro nos estudos citados a importância da ação parácrina das células-tronco, em especial a das células-tronco mesenquimais que têm como principal função terapêutica a sua ação parácrina, como a secreção de moléculas bioativas, estímulo a angiogênese, reparação tecidual, modulação

das reações inflamatórias e imunes, ativação de células progenitoras do próprio tecido onde essas células chegam (ZHAO et al., 2019).

2.5.3 Neofoliculogênese e reestabelecimento da função ovariana

A diferenciação das células-tronco em células ovarianas e a ação parácrina das células, justificaram o sucesso no tratamento de IOP nos estudos de modelo experimental com animais de laboratório citados anteriormente, entretanto, uma outra possibilidade para justificar o sucesso dos tratamentos seria a neofoliculogênese, embora essa possibilidade foi citada apenas por um único trabalho até o momento usando células-tronco para a restauração de ovários lesionados quimicamente (TERRACIANO et al., 2014).

Essa teoria contraria o conceito que todas as fêmeas mamíferas nascem com um número predeterminado de oócitos, que foram produzidos na vida intrauterina; essa abordagem sugeriu que as fêmeas teriam condições de produzir novos oócitos mesmo após o nascimento, a partir de células germinativas proliferativas (JOHNSON et al., 2004). Essa nova teoria gerou grande discussão e até ceticismo por alguns estudiosos no meio científico (TELFER, 2004; GOSDEN et al., 2007). Entretanto, foi constatado que tanto camundongos quanto mulheres possuem uma população de células germinativas mitoticamente ativas que podem ser cultivadas *in vitro* e que posteriormente são capazes de dar origem a oócitos quando transplantadas para ovários de camundongos (WHITE et al., 2012; SILVESTRIS et al., 2019). Embora necessite de mais estudos, esses dados contribuíram para que a teoria da neofoliculogênese deixe de ser tão refutada no meio científico e passe a ser uma das alternativas para explicar o sucesso do tratamento com células-tronco nos experimentos de IOP.

2.6 CTMS e seus efeitos imunomodulatórios.

As CTMs podem atuar por diferentes vias no sistema imunológico, levando a imunossupressão ou estimulação (GLENN; WHARTENBY, 2014). Estes mesmos autores discutem que através da via de atuação inata, as CTMs tem a capacidade de antagonizar determinados subgrupos de mastócitos por influência da secreção própria das CTMs de PGE2, diminuir a secreção oxidativa e apoptose dos neutrófilos, suprimir a degranulação e

produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α) dos mastócitos, inibir a ativação da proliferação de células Natural Killer e impedir o aumento na produção de moléculas co-estimulantes apresentadoras de antígenos (CD40, CD80, CD83 E CD86) pelas células dendríticas, responsáveis pela comunicação entre sistema imunológicos inato e adaptativo. Pela via das células imunes adaptativas, as CTMs podem inibir a proliferação de linfócitos B sem causar apoptose, diminuir a produção de IgG, IgM e IgA, modular a produção de linfócitos T e a produção de citocinas por essas células. Embora, a capacidade imunossupressora das CTMs sejam amplamente discutidas, já foi demonstrada a capacidade imuno estimuladora destas células sobre estímulos específicos, como por exemplo resposta a detecções microbiológicas, fazendo com que as CTMs passem a produzir fatores imuno-regulatórios IDO, PGE2, RANTES e IP-10 ou até pró-inflamatório produzindo citocinas como IL-6 e IL-8.

O conhecimento sobre o comportamento das CTMs em relação ao sistema imunológico já apresentou grandes avanços, entretanto muito ainda precisa ser esclarecido para melhorar o entendimento da ação imunomodulatória das CTMS e seu potencial terapêutico.

2.7 Segurança em relação ao uso clínico das células-tronco

Há algumas lacunas em relação a segurança das células-tronco que precisam ser esclarecidas. A falta de padronização da produção das células, a manutenção do fenótipo, transformações em células cancerígenas, contaminações microbiológicas e meio de cultivo não ideais são alguns dos principais problemas relacionados ao cultivo de células-tronco (RA et al., 2011; WANG et al., 2012; PARK et al., 2020). Apesar de as células-tronco de origem embrionária apresentem vantagem em relação as células-tronco adultas, devido a maior capacidade de diferenciação, ainda há o risco de tumorigênese, colocando assim, as CTAs à frente das embrionárias no quesito segurança.

A terapia com células-tronco mesenquimais proveniente de adipócitos foi considerada segura em inúmeros estudos, testadas para tratamento de feridas, úlcera de córnea isquemia crítica de membros, entre outras condições (LEE et al., 2012; VÉRITER et al., 2015; BATEMAN et al., 2018; BUKOWSKA et al.,

2020) e são consideradas umas das células-tronco mais importantes, visto sua fácil obtenção e capacidade multipotente (MINTEER; MARRA; RUBIN, 2015).

Embora existam estudos onde foram realizadas aplicações intraovarianas de células-tronco (TERRACIANO et al., 2014; MOHAMED et al., 2018), esses estavam mais dedicados a avaliar o efeito das células sobre uma injúria química nos ovários, e não a segurança da terapia. Entretanto, um trabalho descreveu que a aplicação intraovariana de células-tronco mesenquimais humanas em ratas se mostrou segura. As células permaneceram apenas no ovário e não migraram para outros órgãos, desapareceram completamente do ovário em até quatro semanas e o genoma humano não foi detectado na prole dos animais que receberam a aplicação (PARK et al., 2021).

2.8 Terapia com meio condicionado

Uma proposta para utilizar dos benefícios da ação parácrina de células-tronco, amenizando os riscos citados anteriormente é a utilização de meio condicionado de células-tronco. Os inúmeros fatores de crescimento, anti-apoptótico, estimulantes de angiogênese, citocinas anti-inflamatórias entre outros produzidos pelas células-tronco, são incorporados ao meio de produção das células, que quando usado sem as células também acarreta em grandes benefícios para o tratamento de inúmeras doenças. Outra vantagem do meio condicionado é a possibilidade de produção e liofilização, facilitando o armazenamento e transporte (KIM; CHOI; KIM, 2013; YANG et al., 2013; PAWITAN, 2014).

Essa terapia, foi extremamente eficaz para tratar inúmeras condições, como distúrbios neurodegenerativos (KIM; CHOI; KIM, 2013), acidente vascular cerebral (CHO et al., 2012), infartos do miocárdio em que se utilizou meio condicionado derivado de células-tronco mesenquimais oriundas de tecido adiposo, sendo mais eficiente que as próprias células (YANG et al., 2013), entre outras doenças. Em ovários, o meio condicionado de células epiteliais amnióticas humanas demonstrou ser eficaz e até melhor que as próprias células epiteliais amnióticas humanas para tratar ovários lesados por quimioterapias em ratas. A principal justificativa do sucesso do tratamento é o

efeito protetor de algumas citocinas como TGF- β 1, GDF9, BMP15 que evitam a apoptose e possuem efeito angiogênico (ZHANG et al., 2017).

2.8.1 Segurança do meio condicionado

Embora questionados alguns pontos que necessitam de solução, como a falta de padronização na produção (PAWITAN, 2014), a terapia com meio condicionado foi considerada mais segura que a terapia com células-tronco (SAGARADZE et al., 2019); utilizando dos mesmo benefícios da ação parácrina do tratamento com células-tronco, mas sem correr os possíveis riscos da terapia com células-tronco, como rejeição a longo prazo, reação imune local, formação de tecido ectópico, entre outros (KIM; CHOI; KIM, 2013). Dentro da pesquisa realizada, não foi encontrado nenhum trabalho que mostre a segurança da aplicação intraovariana de meio condicionado de células-tronco em nenhuma espécie.

2.9 Aplicação intraovariana de células-tronco e meio condicionado em bovinos.

A literatura sobre o efeito das células-tronco e meio condicionado nos ovários de bovinos é escassa, seja para a compressão da funcionalidade dessa terapia na espécie ou para um modelo de estudo de IOP em mulheres. Um único estudo comprovou que a aplicação intraovariana de células-tronco mesenquimais provenientes de adipócitos apresentou um efeito benéfico no número de oócitos produzidos em vacas que passam por punção folicular (ovum pick-up - OPU). Entretanto, essa técnica não surtiu efeito em vacas com doença cística ovariana e lesões crônicas ovarianas (MALARD et al., 2020).

3 Considerações gerais

Em menos de duas décadas houve um grande avanço na compreensão do funcionamento e aplicabilidade dos mais diversos tipos de células-tronco. Com isso, uma grande esperança surgiu para o tratamento de inúmeras doenças de alto grau de complexidade, incluindo a IOP e outras condições relacionadas a infertilidade em diversas espécies. É fundamental explorar o uso das células-tronco e meio condicionado em ovários bovinos, tanto para aplicação dessa terapia na espécie quanto para investigar a viabilidade de um modelo experimental para os estudos de IOP em mulheres. Entretanto algumas lacunas importantes precisam ser sanadas, como o efeito, a segurança do

método e via de aplicação, influência na dinâmica folicular e possível foliculogênese, considerando o recente conceito de neofoliculogênese.

REFERÊNCIAS¹

ABD-ALLAH, S. H. et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. **Journal of Cytotherapy**, v. 15, n. 1, p. 64–75, 2013.

BADAWY, A. et al. Bone marrow mesenchymal stem cell repair of cyclophosphamide-induced ovarian insufficiency in a mouse model. **International Journal of Women's Health**, v. 9, p. 441–447, 2017.

BARBOSA, A. S. et al. IMPLICAÇÕES BIOÉTICAS NA PESQUISA COM CÉLULAS- TRONCO EMBRIONÁRIAS. **Acta Bioethica**, v. 19, n. 1, p. 87–95, 2013.

BARBOSA, C. F. et al. Inseminação artificial em tempo fixo e diagnóstico precoce de gestação em vacas leiteiras mestiças. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 1, p. 79–84, 2011.

BATEMAN, M. E. et al. Concise Review: Using Fat to Fight Disease: A Systematic Review of Nonhomologous Adipose-Derived Stromal/Stem Cell Therapies. **Stem Cells**, v. 36, n. 9, p. 1311–1328, 2018.

BLUM, B.; BENVENISTY, N. The Tumorigenicity of Human Embryonic Stem Cells. **Advances in Cancer Research**, v. 100, n. 08, p. 133–158, 2008.

BUKOWSKA, J. et al. Safety and Efficacy of Human Adipose-Derived Stromal/Stem Cell Therapy in an Immunocompetent Murine Pressure Ulcer Model. **Stem Cells and Development**, v. 29, n. 7, p. 440–451, 2020.

BYDLOWSKI, S. P. et al. Características biológicas das células-tronco mesenquimais. **REVISTA BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA E HEMOTERAPIA**, v. 31, n. 1, p. 25–35, 2009.

CHO, Y. J. et al. Therapeutic effects of human adipose stem cell-conditioned medium on stroke. **Journal of Neuroscience Research**, v. 90, n. 9, p. 1794–1802, 2012.

DAMOUS, L. L. et al. Does adipose tissue-derived stem cell therapy improve

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação – referências – elaboração. Rio de Janeiro, 2018. 68 p.

graft quality in freshly grafted ovaries ? **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 108, p. 1–11, 2015.

DOROTEU, E. M.; OLIVEIRA, R. A. DE; PIVATO, I. Avaliação de diferentes doses de eCG na ressincronização da ovulação em vacas nelore lactantes submetidas à IATF. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 16, n. 2, p. 449–457, 2015.

ELFAYOMY, A. K. et al. 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 and Cell**, v. 48, n. 4, p. 370–382, 2016.

FIEDLER, S. D. et al. Hormonal Regulation of MicroRNA Expression in Periovulatory Mouse Mural Granulosa Cells. **BIOLOGY OF REPRODUCTION**, v. 1037, n. 79, p. 1030–1037, 2008.

FU, 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 research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 187, 2017.

GEBREMEDHN, S. et al. MicroRNA Expression Profile in Bovine Granulosa Cells of Preovulatory Dominant and Subordinate Follicles during the Late Follicular Phase of the Estrous Cycle. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–26, 2015.

GLENN, J. D.; WHARTENBY, K. A. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. **World Journal of Stem Cells**, v. 6, n. 5, p. 526–539, 2014.

GOSDEN, R. G. et al. Prevalence of premature ovarian failure in monozygotic and dizygotic twins. **Human Reproduction**, v. 22, n. 2, p. 610–615, fev. 2007.

HAECKEL, E. **Anthropogenie; oder, Entwicklungsgeschichte des menschen, Keimes- und stammesgeschichte**. 3. ed. JENA: [s.n.].

HERRAIZ, S. et al. Fertility rescue and ovarian follicle growth promotion by bone marrow stem cell infusion. **Fertility and Sterility**, v. 109, n. 5, p. 908-918.e2, 2018.

HOSSAIN, M. et al. Identification and characterization of miRNAs expressed in the bovine ovary. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 443, 2009.

JOHNSON, J. et al. Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal

mammalian ovary. **nature**, v. 428, p. 145–151, 2004.

KALRA, K.; TOMAR, P. C. Stem Cell : Basics , Classification and Applications. **American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics**, v. 2, n. 7, p. 919–930, 2014.

KIM, H. O.; CHOI, S.; KIM, H. Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 10, n. 3, p. 93–101, 25 jun. 2013.

LAI, D. et al. Human endometrial mesenchymal stem cells restore ovarian function through improving the renewal of germline stem cells in a mouse model of premature ovarian failure. **Journal of Translational Medicine**, v. 13, n. 155, p. 1–13, 2015.

LEE, H. C. et al. Safety and effect of adipose tissue-derived stem cell implantation in patients with critical limb ischemia: - A pilot study -. **Circulation Journal**, v. 76, n. 7, p. 1750–1760, 2012.

LI, J. et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve the reserve function of perimenopausal ovary via a paracrine mechanism. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2017.

LIN, S. Y. et al. Regulation of ovarian function by the TGF- β superfamily and follistatin. **Reproduction**, v. 126, n. 2, p. 133–148, 2003.

LIU, T. et al. 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 and Cell Biology**, v. 32, n. 12, p. 685–698, 2013.

LIU, T. et al. Transplantation of human menstrual blood stem cells to treat premature ovarian failure in mouse model. **Stem Cells and Development**, v. 23, n. 13, p. 1548–1557, 2014.

LIU, T. et al. Transplantation of ovarian granulosa-like cells derived from human induced pluripotent stem cells for the treatment of murine premature ovarian failure. **Molecular Medicine Reports**, v. 13, n. 6, p. 5053–5058, 2016.

LÖFFLER, S. et al. The transient disappearance of cytokeratin in human fetal and adult ovaries. **Anatomy and Embryology**, v. 201, n. 3, p. 207–215, 2000.

LOPES, C. T. A. et al. Células-tronco e reprodução animal: Aplicações em potencial. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, n. SUPPL. 2, p. 299–301, 2014.

MAGA, G.; HÜBSCHER, U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): A dancer with many partners. **Journal of Cell Science**, v. 116, n. 15, p. 3051–3060, 2003.

MALARD, P. F. et al. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. **nature**, p. 1–12, 2020.

MANSHADI, M. D. et al. The effects of human menstrual blood stem cells-derived granulosa cells on ovarian follicle formation in a rat model of premature ovarian failure. **Microscopy research e technique**, v. 82, n. July 2018, p. 635–642, 2018.

MINTEER, D. M.; MARRA, K. G.; RUBIN, J. P. Adipose stem cells: Biology, safety, regulation, and regenerative potential. **Clinics in Plastic Surgery**, v. 42, n. 2, p. 169–179, 2015.

MOHAMED, S. A. et al. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. **Reproductive Sciences**, v. 25, n. 1, p. 51–63, 2018.

MOHAMED, S. A. et al. Umbilical cord blood mesenchymal stem cells as an infertility treatment for chemotherapy induced premature ovarian insufficiency. **Biomedicines**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2019.

MUMMERY, C. et al. Regenerative Medicine. In: **Stem Cells**. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2014. p. 163–233.

MUSKHELISHVILI, L.; WINGARD, S. K.; LATENDRESSE, J. R. Proliferating Cell Nuclear Antigen—A Marker for Ovarian Follicle Counts. **Toxicologic Pathology**, v. 33, n. 3, p. 365–368, 25 abr. 2005.

PANAY, N.; FENTON, A. Premature ovarian failure: a growing concern. **Climacteric**, v. 11, n. 1, p. 1–3, 3 jan. 2008.

PARK, H.-S. et al. Safety and Toxicology Study After Intra-Ovarian Engraftment of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell in Chemotherapy Induced Poi Mouse Model. **Fertility and Sterility**, v. 114, n. 3, p. e99–e100, 2020.

PARK, H. et al. Safety of Intraovarian Injection of Human Mesenchymal Stem Cells in a Premature Ovarian Insufficiency Mouse Model. **Cell Transplantation**, v. 30, p. 096368972098850, 1 jan. 2021.

PAWITAN, J. A. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–14, 2014.

- RA, J. C. et al. Safety of Intravenous Infusion of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells in Animals and Humans. **Stem Cells and Development**, v. 20, n. 8, p. 1297–1308, ago. 2011.
- RAMALHO-SANTOS, M.; WILLENBRING, H. Commentary On the Origin of the Term “ Stem Cell ”. **Cell Stem Cel**, v. 1, n. 1, p. 35–38, 2007.
- REIS, V. W. S. et al. A Utilização de Células-tronco em Doenças Cardíacas: Apresentação dos Estudos Publicados no Brasil. **Saúde e Pesquisa**, v. 8, n. 2, p. 363, 2015.
- SAGARADZE, G. et al. Conditioned medium from human mesenchymal stromal cells: Towards the clinical translation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1–16, 2019.
- SEN, A. K.; DOLEY, R. M.; TIMUNG, D. S. Stem Cell and Regenerative Medicine. **JOURNAL OF INTERNAL MEDICINE**, v. 6, n. 2, p. 18–23, 2016.
- SHIMIZU, T. et al. Changes of Messenger RNA Expression of Angiogenic Factors and Related Receptors During Follicular Development in Gilts 1. v. 1852, n. October, p. 1846–1852, 2002.
- SILVESTRIS, E. et al. In Vitro Generation of Oocytes from Ovarian Stem Cells (OSCs): In Search of Major Evidence. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 24, p. 6225, 10 dez. 2019.
- SINGH, S. et al. Multiple roles of intermediate filaments. **Cytobios**, v. 77, n. 308, p. 41–57, 1994.
- SUN, M. et al. Adipose-derived stem cells improved mouse ovary function after chemotherapy-induced ovary failure. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 4, p. 1–9, 2013.
- TELFER, E. E. Germline stem cells in the postnatal mammalian ovary : A phenomenon of prosimian primates and mice ? v. 2, p. 6–7, 2004.
- TERRACIANO, P. et al. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice. **Stem Cells International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- TOWNSON, D. H. et al. Expression and distribution of cytokeratin 8/18 intermediate filaments in bovine antral follicles and corpus luteum: An intrinsic mechanism of resistance to apoptosis? **Histology and Histopathology**, v. 25, n. 7, p. 889–900, 2010.
- VÉRITER, S. et al. Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in Cell Therapy: Safety and Feasibility in Different “Hospital Exemption” Clinical

Applications. **PLOS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139566, 20 out. 2015.

VUJOVIĆ, S. et al. Premature ovarian failure. **Srpski Arhiv za Celokupno Lekarstvo**, v. 140, n. 11–12, p. 806–811, 2012.

WANG, F. et al. Human amniotic epithelial cells can differentiate into granulosa cells and restore folliculogenesis in a mouse model of chemotherapy-induced premature ovarian failure. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 4, n. 5, 2013a.

WANG, S. et al. The Therapeutic Potential of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Mice Premature Ovarian Failure. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 1, p. 1–12, 2013b.

WANG, Y. et al. Safety of Mesenchymal Stem Cells for Clinical Application. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1–4, 2012.

WANG, Z. et al. Study of the reparative effects of menstrual-derived stem cells on premature ovarian failure in mice. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–14, 2017a.

WHITE, Y. A. R. et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. **Nature Medicine**, v. 18, n. 3, p. 413–421, 2012.

XIAO, G. Y. et al. Exosomal miR-10a derived from amniotic fluid stem cells preserves ovarian follicles after chemotherapy. **Scientific Reports**, v. 6, n. March, p. 1–12, 2016.

YANG, D. et al. The Relative Contribution of Paracrine Effect versus Direct Differentiation on Adipose-Derived Stem Cell Transplantation Mediated Cardiac Repair. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–11, 19 mar. 2013.

ZHANG, Q. et al. Paracrine effects of human amniotic epithelial cells protect against chemotherapy-induced ovarian damage. **Stem Cell Research and Therapy**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2017.

ZHAO, Y. et al. Review Article Using Mesenchymal Stem Cells to Treat Female Infertility : An Update on Female Reproductive Diseases. **Stem Cells International**, v. 2019, n. 1, p. 1–10, 2019.

Aplicação intraovariana de células-tronco mesenquimais e meio condicionado em bovinos: Uma terapia segura e promissora²

Lucas Monteiro do Carmo^a; Beatriz Lippe De Camillo^a; Stella Teobaldo Tironi^a; Andressa Filaz Vieira^a; Bernardo Marcozzi Bayeux^c; Alice Pereira Maciel^a; Edjalma Rodrigues Silva- Junior^a; Alessandra Gomes Souza^a; Viviane Maria Codognoto^a; Juliana de Oliveira Bernardo^d; Rogério Antonio de Oliveira^b; Fernanda da Cruz Landim^a; João Carlos Pinheiro Ferreira^a; Eunice Oba^a.

^a Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade Estadual Paulista Distrito De Rubião Jr S/N, Botucatu, São Paulo 18618-970, Brasil.

^b Departamento de Bioestatística, Instituto de Biociências de Botucatu– IBB. Universidade Estadual Paulista Distrito De Rubião Jr S/N, Botucatu, São Paulo 18618-970, Brasil.

^c Departamento de Reprodução Animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

^d Fazenda Experimental da Faculdade de Ciências Sociais e Agrárias de Itapeva, Itapeva, Brasil.

Correspondência do autor:

Departamento de Cirurgia Veterinária e Reprodução Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia- Universidade Estadual Paulista Distrito De Rubião Jr S/N, Botucatu, São Paulo 18618-970, Brasil.

E-mail: eunice.oba@unesp.br

Telefone: (14) 997758525

Palavras-chave: vacas; insuficiência ovariana prematura; terapia com células.

² Artigo redigido de acordo com as normas da revista Theriogenology:

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/525024?generatepdf=true

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>.