



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL REGENERATIVO DE VESÍCULAS
EXTRACELULARES DERIVADAS DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS
BOVINAS SOBRE CÉLULAS ESTROMAIS OVARIANAS E MODELO DE LESÃO
OVARIANA *IN VIVO*

STEFHANI MARTINS DE BARCELOS

BRASÍLIA-DF

2023

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICA
STEFHANI MARTINS DE BARCELOS

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília.

Orientador: Professora Dra. Juliana Lott de Carvalho

Coorientador: Professor Dr. Felipe Perecin

BRASÍLIA-DF

2023

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus pelo dom da vida e a intercessão de Nossa Senhora Aparecida. Em todos os momentos, principalmente os mais difíceis e de maior ansiedade, foi durante as minhas orações que encontrei refúgio e forças para continuar.

Aos meus pais, Eva Martins e Marcos Barcelos, obrigada por cada ensinamento. Mãe, saiba que sempre será meu pilar e minha maior inspiração de força e fé! Sempre que penso que não sou capaz, você me mostra que me criou para o mundo e que sou capaz de realizar tudo o que sempre sonhei se eu me esforçar para isso, obrigada por sempre restaurar minhas forças com seu abraço que cura e me acalma!

Ao meu marido, Paulo Geovane, obrigada por ser o meu maior incentivador, quem mais acredita no meu potencial e não poupa esforços para realizar os meus desejos. Saiba que a realização desse sonho seria muito mais difícil se eu não tivesse você ao meu lado. Obrigada por tudo!

Agradeço às minhas irmãs Amanda e Marina Barcelos, por todo o incentivo e por depositarem em mim tanta confiança, obrigada por alegrarem a minha vida!

Aos meus tios e tias, primos e afilhados, obrigada por todo o incentivo!

Agradeço aos meus sogros, Maria e Antônio, e também a minha cunhada Patrícia por todo apoio e assistência, sorte a minha ter vocês em minha vida.

Aos meus amigos mais antigos, obrigada por entender o distanciamento e sempre me apoiarem. Aos novos, sejam-bem vindos! Deixo meu agradecimento a vocês, Mavi, Vitória, Emãnuella, Elizabete e Amandda por tornarem meus dias mais leves e mais felizes! Apesar de árdua, a jornada acadêmica tem sido cada vez mais prazerosa ao lado de cada uma de vocês. Agradeço por cada troca de conhecimento e, principalmente, o acolhimento que tive em cada uma de vocês.

Agradeço imensamente à minha orientadora Juliana Lott por toda paciência, dedicação e colaboração. Serei eternamente grata pela oportunidade de ingressar em seu grupo de pesquisa e me permitir realizar parte da minha jornada acadêmica. A cada reunião minha admiração por você apenas aumentava, obrigada por nos conduzir tão bem!

Agradeço ao Laboratório Interdisciplinar de Biociências e a todos do laboratório por me receberem tão bem! Um agradecimento especial para a professora Luciana Hagstrom por todos os conselhos e sugestões!

A todos da empresa Bio Cell, agradeço pelo fornecimento de dados e materiais que foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa que possibilitou a realização deste trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento da USP pelo fornecimento de dados e materiais. Ao professor Felipe Perecin, agradeço pela coorientação e por todo tempo dedicado a construir este trabalho. Ao professor Juliano da Silveira, agradeço pela colaboração, além do tempo e trabalho, dedicado a contribuir de forma indispensável neste trabalho.

Agradeço a Alessandra Bridi por ter sido minha mentora durante o mestrado e minha grande inspiração!

Agradeço a minha resiliência e persistência que me fez continuar mesmo diante de algumas dificuldades e ansiedade.

Por fim, agradeço a todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa, enriquecendo o meu processo de aprendizado.

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

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Com o aumento da taxa de infertilidade, há uma demanda crescente por técnicas como reprodução assistida e produção *in vitro* de embriões. A punção folicular (*Ovum pick-up* - OPU) é uma etapa intrínseca dos procedimentos de fertilização *in vitro*. No entanto, pode causar lesões ovarianas e comprometer a fertilidade feminina. Recentemente, nosso grupo demonstrou que a injeção intraovariana de células-tronco mesenquimais (CTM) preserva a função ovariana. Dado que as vesículas extracelulares derivadas das CTM (CTM-VEs) apresentam efeitos terapêuticos atribuídos às CTMs e que apresentam vantagens logísticas e regulatórias em comparação com a terapia celular, avaliamos se as CTM-VEs também seriam eficazes no tratamento de lesões agudas induzidas por OPU. Para realizar o estudo, as CTMs foram obtidas a partir do tecido adiposo bovino e caracterizadas de acordo com as diretrizes da Sociedade Internacional de Terapia Celular. Em seguida, as CTM-VEs foram isoladas a partir do secretoma dessas células, por meio de ultrafiltração (UF) e ultracentrifugação (UC) e avaliadas de acordo com o tamanho, concentração e capacidade de indução de migração e proliferação de células estromais do ovário bovino. Após comparar os dois métodos de isolamento, a eficácia das CTM-VEs foi avaliada em um modelo animal de lesão ovariana aguda. Para isso, utilizamos vacas que foram submetidas a quatro sessões de OPUs, sendo que uma lesão ovariana foi induzida por punções seriadas após a primeira sessão. As vacas foram distribuídas em quatro grupos, nos quais foram aplicados três diferentes regimes terapêuticos de CTM-VEs. No primeiro grupo, as vacas receberam apenas o veículo após a primeira punção folicular. No segundo grupo, as vacas receberam vesículas (VEs) produzidas por $7,5 \times 10^6$ CTMs após a primeira punção folicular. No terceiro grupo, injetamos VEs produzidas por $2,5 \times 10^6$ CTMs após a primeira sessão, e no quarto grupo, a mesma quantidade de VEs foi injetada após as sessões 1, 2 e 3. A caracterização das vesículas revelou que o tamanho das partículas foi semelhante nos diferentes métodos de isolamento; entretanto, o método UF gerou maior rendimento de CTM-VEs. Em ambos métodos de obtenção, as CTM-VEs demonstraram capacidade semelhante para promover a migração e proliferação de células estromais ovarianas. Considerando o maior rendimento e menor complexidade no método UF, CTM-VEs obtidas por UF foram utilizadas no experimento *in vivo*. Entre os três regimes terapêuticos avaliados o grupo tratado com três injeções de CTM-VEs (G4) foi capaz de manter a produção de oócitos e aumentar a produção de embriões *in vitro*, em comparação ao controle (G1), após a indução da lesão. Em resumo, as CTM-VEs apresentaram efeitos benéficos tanto na migração e proliferação de células estromais ovarianas *in vitro* quanto na fertilidade de vacas com lesão por OPU *in vivo*. Esses resultados fornecem *insights* promissores para o desenvolvimento de terapias baseadas em CTM-VEs no campo da reprodução assistida e tratamento da infertilidade.

Palavras-chave: Infertilidade; Reprodução assistida; Produção *in vitro* de embriões; Medicina regenerativa; Vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais; Ultracentrifugação; Ultrafiltração.

ABSTRACT

With the rising incidence of infertility, there is an increasing demand for techniques such as assisted reproduction and *in vitro* embryo production. Ovum pick-up (OPU) is an essential step *in vitro* fertilization; however, it can damage ovarian and compromise female fertility. In a recent study, our group demonstrated that intraovarian injection of mesenchymal stem cells (MSCs) can preserve ovarian function. Considering that MSC-derived extracellular vesicles (MSC-EVs) possess therapeutic effects similar to MSCs and offer logistical and regulatory advantages over cell therapy, our aim was to investigate the effectiveness of MSC-EVs in the treatment of acute OPU-induced injuries. To conduct this study, MSCs were obtained from bovine adipose tissue and characterized following the International Society for Cell Therapy guidelines. Subsequently, MSC-EVs were isolated from the secretome of these cells using ultrafiltration (UF) and ultracentrifugation (UC) techniques. The isolated MSC-EVs were evaluated for size, concentration, and their ability to induce migration and proliferation of bovine ovarian stromal cells. After comparing the two isolation methods, the effectiveness of MSC-EVs was assessed using an animal model of acute ovarian injury. Cows were subjected to four sessions of OPU, and an ovarian lesion was induced by OPUs following the first session. The cows were divided into four groups, each receiving different therapeutic regimens of MSC-EVs. The first group received only the vehicle after the initial OPU. In the second group, cows were injected with vesicles (EVs) produced by 7.5×10^6 MSCs after the first OPU. The third group received EVs produced by 2.5×10^6 MSCs after the first session, while the fourth group received the same number of VEs after sessions 1, 2, and 3. Characterization of the EVs revealed that the particle size was similar between the two isolation methods, but the UF method yielded a higher quantity of MSC-EVs. Regardless of the isolation method, MSC-EVs demonstrated comparable abilities to promote migration and proliferation of ovarian stromal cells. Considering the higher yield and lower complexity associated with the UF method, MSC-EVs obtained through UF were utilized in the *in vivo* experiment. Among the three therapeutic regimens evaluated, the group treated with three injections of MSC-EVs (G4) demonstrated the ability to maintain oocyte production and increase *in vitro* embryo production compared to the control group (G1) after injury induction. In conclusion, MSC-EVs exhibited beneficial effects on both the migration and proliferation of ovarian stromal cells *in vitro* and on the fertility of OPU-injured cows *in vivo*. These findings provide promising insights for the development of MSC-EV-based therapies in the field of assisted reproduction and infertility treatment.

Keywords: Infertility; Assisted reproduction, *in vitro* embryo production, regenerative medicine, extracellular vesicles derived from mesenchymal stem cells, Ultracentrifugation; Ultrafiltration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem representativa das estruturas do ovário.

Figura 2: Fatores que podem afetar a qualidade da reserva ovariana.

Figura 4: Etapas da fertilização *in vitro*.

Figura 4: Componentes da medicina regenerativa.

Figura 5: As células-tronco apresentam potencial de autorreplicação e diferenciação celular.

Figura 6: Requisitos para caracterização das populações de CTMs segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular.

Figura 7: Parâmetros morfológicos de classificação das vesículas extracelulares.

Figura 8: Desenho experimental do estudo *in vitro* (A) e *in vivo* (B).

Figura 9: Diferenciação multipotente das células-tronco mesenquimais.

Figura 10: Histogramas representativos da análise de nanopartículas por rastreamento.

Figura 11: Análise de nanopartículas por rastreamento.

Figura 12: Painel representativo do ensaio de migração celular com células estromais de ovários bovinos.

Figura 13: Avaliação da área aberta após 48 horas de tratamento das células estromais bovinas tratadas com SFB (controle positivo - C+), ou sem SFB (controle negativo, C-) e os respectivos tratamentos experimentais.

Figura 14: Histogramas representativos da proliferação de células estromais obtidas de ovários bovinos mantidos em diferentes condições experimentais por 96 horas.

Figura 15: Avaliações de porcentagem de células proliferativas e tempo médio de duplicação de células estromais obtidas de ovários bovinos e mantidas em diferentes condições experimentais por 96 horas.

Figura 16: Gráfico representativo da expressão relativa de genes envolvidos no processo de regeneração em células estromais de ovários bovinos.

Figura 17: Recuperação de oócitos viáveis após injeção intraovariana de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais bovinas em um modelo de lesão ovariana aguda.

Figura 18: Produção *in vitro* de embriões após injeção intraovariana de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais bovinas em um modelo de lesão ovariana aguda.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo de trabalhos utilizando CTMs de diferentes fontes com o objetivo de recuperação da função ovariana.

Tabela 2: Grupos experimentais com base no número de vesículas produzidas por 20 mil células-tronco mesenquimais bovinas, de acordo com cada método de obtenção e o secretoma utilizado para isolar essa quantidade de vesículas.

Tabela 3: Sequência de iniciadores.

Tabela 4: Expressão de marcadores utilizados na imunofenotipagem de células-tronco bovinas expresso em porcentagem.

LISTA DE ABREVIATURAS

AKT: Proteína Quinase B

ATM: Ataxia-telangiectasia mutada

ATP: Adenosina trifosfato

BCRA1: *Breast Cancer gene 1*

BCRA2: *Breast Cancer gene 2*

CCO: Complexos cumulus-oócitos

cDNA: DNA complementar

CFSE: Carboxifluoresceína succinimidil éster

cm: Centímetros

c-Myc: Mielocitomatose Celular

CO₂: Dióxido de carbono

COL1A1: Colágeno tipo 1

CTGF: *Connective Tissue Growth Factor* (Fator de Crescimento do Tecido Conjuntivo)

CTH: Células-tronco Hematopoiéticas

CTMs: Células-tronco Mesenquimais

CTM-VEs: Vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais

CTN: Células-tronco Neurais

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium low glucose*

DNA: *Deoxiribonucleic acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

DPBS: *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (Solução salina tamponada com fosfato de Dulbecco)

ESCRTs: *Endosomal Sorting Complex Required for Transport* (Complexo de Classificação Endossomal Requerido para Transporte)

FGF: *Fibroblast Growth Factor* (fator de crescimento de fibroblastos)

FIV: Fertilização *in vitro*

FSH: Hormônio Folículo Estimulante

HGF: *Hepatocyte Growth Factor* (Fator de crescimento de hepatócitos)

HLA-DR: Antígeno Leucocitário Humano-D

ICSI: *Intracytoplasmic Sperm Injection* (injeção intracitoplasmática de espermatozoides)

IFN- γ : Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

IL-1 β : Interleucina 1 beta

ILs: Vesículas Intraluminais

ISEV: *International Society for Extracellular Vesicles* (Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares)

KLF4: Fator 4 semelhante a Kruppel

LMMD: Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento

MEC: Matriz Extracelular

mL: Mililitro

mm: Milímetros

MVBs: *Multivesicular Bodies* (Corpos Multivesiculares)

NICE: *National Institute for Health and Care Excellence* (Instituto Nacional de Excelência em Saúde e Cuidados)

Nm: Nanômetros

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPU: *Ovum pick-up* (punção folicular)

PBS: *Phosphate Buffer Saline* (Tampão fosfato-salino)

PGE2: Prostaglandina E2

qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction* (PCR quantitativa)

SFB: Soro Fetal Bovino

TCM 199: Meio de Cultura Tecidual

TE: Transferência de Embriões

TEMs: *Tetraspanin Enriched Microdomains* (Microdomínios Enriquecidos com Tetraspanina)

TGF- β 1: Fator de Crescimento Transformante B1

TNF- α : *Tumour Necrosis Factor- α* (Fator de Necrose Tumoral alfa)

TRA: Terapia de Reprodução Assistida

UC: Ultracentrifugação

UF: Ultrafiltração

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor* (Fator de Crescimento Endotelial Vascular)

VEs: Vesículas Extracelulares

μ L: Microlitro

$^{\circ}$ C: Graus Celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. Diminuição da população folicular e infertilidade.....	17
2.1. Fatores que influenciam a qualidade dos oócitos	20
2.2. Reprodução assistida e produção <i>in vitro</i> de embriões.....	22
3. Medicina Regenerativa.....	24
3.1. Células-tronco	25
3.2. Classificação das células-tronco quanto ao potencial de diferenciação.....	26
3.3. Classificação das células-tronco com base na origem	27
3.4. Aspectos básicos das CTMs e mecanismos de ação terapêutica	29
3.5. Uso das CTMs na terapia reprodutiva	31
3.6. Efeito parácrino das CTMs	32
4. Vesículas Extracelulares	33
4.1. Biogênese das vesículas extracelulares.....	35
4.2. Composição das vesículas extracelulares	36
4.3. Vesículas Extracelulares derivadas de CTMs na medicina regenerativa e reprodução 38	
4.4. Utilização de vacas como modelo animal experimental para a reprodução humana	39
4.5. Tratamento de lesões ovarianas associadas ao procedimento de OPU utilizando-se CTMs	40
5. JUSTIFICATIVA.....	41
6. HIPÓTESE:.....	42
7. OBJETIVOS.....	42
7.2. Específicos:.....	42
8. MATERIAIS E MÉTODOS	43
8.1. Aprovação em comitê de ética.....	43
8.2. Desenho experimental.....	43
8.3. Isolamento das CTMs	45
8.4. Imunofenotipagem das CTMs	45
8.5. Diferenciação celular	46
8.6. Esterilidade das CTMs.....	46
8.7. Obtenção do Secretoma das CTM	46
8.8. Isolamentos das CTM-VEs	47
8.9. Isolamento por Ultrafiltração.....	47
8.10. Isolamento por ultracentrifugação	47

8.11.	Caracterização das vesículas.....	47
8.12.	Grupos experimentais <i>in vitro</i>	48
8.13.	Isolamento das células estromais bovinas	48
8.14.	Ensaio de migração celular	49
8.15.	Ensaio de proliferação celular.....	49
8.16.	Cálculo do tempo de duplicação celular	50
8.17.	Extração de RNA.....	50
8.18.	Síntese de DNA complementar (Transcrição Reversa)	51
8.19.	PCR em tempo real	51
8.20.	Animais e Localização.....	51
8.21.	Aspiração folicular guiada por via transvaginal e injeção das CTM-VEs.....	52
8.22.	Produção <i>in vitro</i> de embriões	52
8.23.	Análise estatística	53
9.	RESULTADOS.....	54
9.1.	Isolamento de CTMs, cultivo e caracterização.....	54
9.2.	Isolamento e caracterização de CTM-VEs	55
9.3.	Capacidade migratória das células estromais tratadas com as CTM-VEs.....	57
9.4.	Potencial proliferativo das células estromais bovinas tratadas com as CTM-VEs....	58
9.5.	Avaliação da expressão de genes associados ao processo regenerativo em células do estroma ovariano bovino	60
9.6.	Recuperação de oócitos no modelo de lesão aguda <i>in vivo</i>	61
9.7.	Produção <i>in vitro</i> de embriões	62
10.	DISCUSSÃO.....	64
11.	CONCLUSÃO.....	70
12.	REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade é uma questão significativa, tanto do ponto de vista da saúde como social. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a infertilidade é um desafio de saúde global que afeta aproximadamente 17,5% da população mundial. Esse aumento considerável de casos de infertilidade é resultado do crescente número de mulheres que escolhem engravidar em idades mais avançadas, o que, por sua vez, tem levado a um aumento na demanda por tecnologias de reprodução assistida (TRA). No entanto, apesar de ser considerada como tratamento definitivo para a infertilidade prolongada, a eficácia das TRA diminui com o avanço da idade feminina, de acordo com o desempenho natural da fertilidade após os 35 anos (LEE et al., 2018).

A diminuição da reserva ovariana é a principal característica do envelhecimento ovariano, sendo um fator crucial para determinar o resultado da produção *in vitro* de embriões. Nesse contexto, o campo da medicina regenerativa tem despertado crescente interesse devido ao avanço das pesquisas sobre o potencial terapêutico das células-tronco mesenquimais (CTMs) e das vesículas extracelulares derivadas dessas células (CTM-VEs). Essas investigações visam utilizar essas terapias como uma abordagem promissora para a recuperação de oócitos nos procedimentos de tecnologia de reprodução assistida, devido à sua capacidade de promover efeitos positivos em lesões induzidas por punção folicular, falência ovariana prematura e síndrome dos ovários policísticos (HUANG et al., 2018; MALARD et al., 2020).

As CTMs apresentam eficácia terapêutica em diversos distúrbios imunológicos (BALL et al 2013) e lesões agudas e crônicas (CICCOCIOPPO et al., 2015). Embora grande parte dos estudos tenha sido realizado em roedores, no contexto da fisiologia ovariana os efeitos positivos das CTMs podem ser explicados pela sua ação nas células da granulosa, bem como seus efeitos anti-inflamatório, antiapoptótico e regenerativo, mediados em grande parte de forma parácrina (YOON et al 2018). A ação parácrina das CTMs é decorrente da liberação de fatores de crescimento, quimiocinas, citocinas e vesículas extracelulares (VEs) que podem apresentar aplicações em processos de imunomodulação e regeneração (BERNARDO; FIBBE, 2013). Estudos usando modelo murino de falência ovariana prematura demonstraram que a injeção intraperitoneal de VEs derivados de CTMs aumentou o número de folículos saudáveis, restaurou o ciclo estral e melhorou a função ovariana (YANG et al., 2020). No entanto, apesar dos resultados promissores, os roedores diferem significativamente dos humanos no que tange o sistema reprodutor feminino (PIPER M. TREUTING, 2018). Dessa forma, o modelo bovino

não somente é o mais semelhante aos humanos no contexto da fisiologia reprodutiva (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2003) como constitui um modelo economicamente relevante na produção *in vitro* de embriões (MALARD et al., 2020), podendo impactar positivamente a economia por aumentar a vida reprodutiva após a terapia com as CTM-VEs.

2. Diminuição da população folicular e infertilidade

O ovário é o órgão responsável pela produção dos oócitos e hormônios que regulam as funções reprodutivas. As funções do ovário são realizadas de forma coordenada através de diversas populações celulares e o estroma ovariano. Existem dois componentes principais que compõem os órgãos, o parênquima, tecido especializado que desempenha a função do órgão e o estroma, responsável pela sustentação (KINNEAR et al., 2020). Os folículos ovarianos são as unidades funcionais dos ovários e compõem o parênquima ovariano, enquanto que o estroma ovariano é composto nervos, células imunes, vasos linfáticos e principalmente por células estromais, semelhantes a fibroblastos (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009; KINNEAR et al., 2020; NEILSON et al., 1970; WU et al., 2007). A cada ciclo reprodutivo ocorre o desenvolvimento de novos folículos ovarianos, o que leva esse órgão a passar por constantes mudanças. Esse desenvolvimento ocorre a partir de um conjunto de folículos primordiais, que constituem as principais estruturas reprodutivas do ovário e são responsáveis em determinar tanto o potencial reprodutivo quanto a expectativa de vida reprodutiva (MCGEE; HSUEH, 2000).

Os folículos primordiais consistem em um oócito cercado por uma camada de células da granulosa (EDSON; NAGARAJA; MATZUK, 2009) e o número de folículos é determinado durante a vida fetal (TE VELDE et al., 1998). No estágio inicial do desenvolvimento embrionário, as células germinativas se separam das células somáticas e parte delas migram para a crista gonadal, onde se multiplicam para formar a reserva folicular que deverá atender as necessidades da reprodução feminina. No estágio diplóteno da primeira divisão meiótica, o desenvolvimento do oócito é interrompido e permanece quiescente. Sua ativação e desenvolvimento oocitário podem ser iniciados até mesmo antes do nascimento ou por uma variedade de fatores endócrinos durante a puberdade (ANSERE et al., 2021) Após esses fatores, todo o ovário, juntamente com os folículos, começa a crescer. O crescimento folicular inicia-se com a retomada da proliferação das células da granulosa, que formam uma camada ao redor do folículo. Uma vez que o folículo esteja circundado por uma camada completa de células da granulosa e apresente uma zona pelúcida, ele é considerado um folículo primário. À medida

que as células da granulosa se multiplicam, o folículo desenvolve duas ou três camadas dessas células e também células da teca ao redor da membrana basal, passando a ser chamado de folículo secundário. Com a organização de várias camadas das células da granulosa e o desenvolvimento das células da teca interna e externa, ocorre a formação de uma cavidade preenchida por fluido, denominada antro. Esse fluido folicular contém água, eletrólitos, proteínas e quantidades significativas de hormônios esteróides secretados pelas células da granulosa. Nesta fase, os folículos são denominados folículos terciários ou folículos antrais. Resumidamente, a primeira fase do crescimento folicular consiste no aumento do óvulo, seguido do crescimento de camadas adicionais das células da granulosa até tornarem-se folículos maduros e, posteriormente, acontecer o rompimento do folículo com a liberação do oócito para a ovulação (TE VELDE et al., 1998). O folículo então regride, com a formação do corpo lúteo até a formação de uma cicatriz denominada corpo albicans (Figura 1).

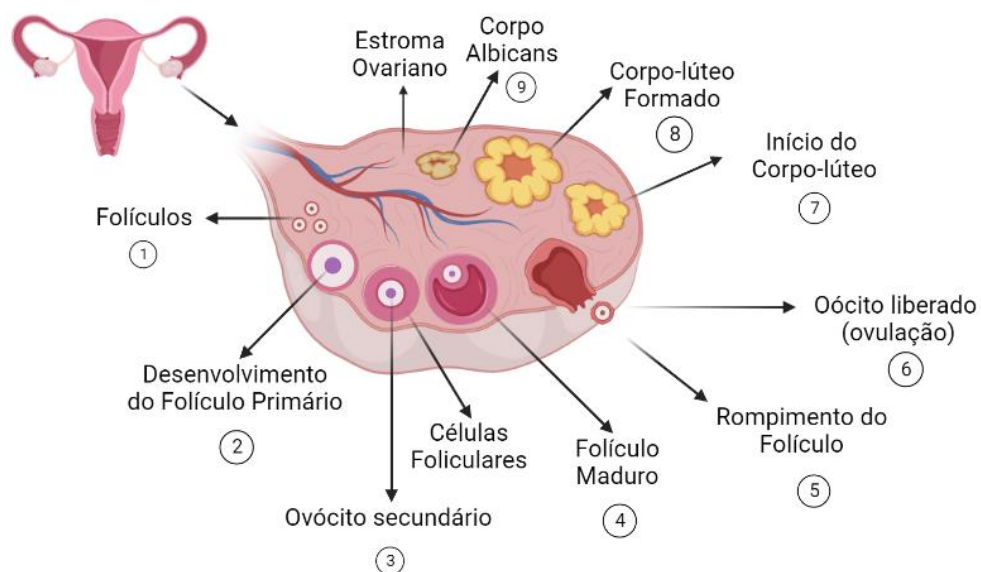


Figura 1: Imagem representativa das estruturas do ovário. Os folículos (1) se desenvolvem em folículos primários (2) até tornarem-se folículos maduros (3-4). Após o amadurecimento folicular acontece o rompimento do folículo (5) e liberação do oócito, caracterizando a ovulação (6). Posteriormente, há a formação do corpo lúteo (7-8) e quando ocorre sua regressão é formada uma cicatriz denominada corpo albicans (9). Fonte: Arquivo pessoal.

Atualmente, o número de mulheres que optam pela gravidez tardia torna-se cada vez maior, o que aumenta o risco de gestações mal sucedidas (CHANDRA; STEPHEN, 2010), uma vez que a incapacidade de obter sucesso na fertilização em mulheres acima de 45 anos é uma característica importante relacionada ao envelhecimento ovariano (ANSERE et al., 2021). A depleção da reserva folicular ovariana, composta por folículos primordiais, é uma das causas do declínio da fertilidade feminina, assim como a remodelação contínua do estroma ovariano que ocorre desde a puberdade, favorecendo o aparecimento de fibrose devido ao aumento de deposição da matriz extracelular (MEC) ovariana, o que afeta negativamente a função do tecido, uma vez que a MEC influencia a função celular do órgão (CARVALHO, 2012).

A expectativa da vida reprodutiva é específica para cada espécie. Em humanos, a exaustão da reserva ovariana ocorre por meio da atresia folicular que leva à senescência ovariana, conhecida como menopausa. Vários fatores podem afetar a qualidade dos oócitos. Por exemplo, foi demonstrado em estudos utilizando modelos murinos e humanos que a longa permanência dos folículos primordiais na fase de prófase I da meiose (CHIANG; SCHULTZ; LAMPSON, 2012) favorece o acúmulo de danos no DNA dos oócitos (TITUS et al., 2013). Ademais, fatores cromossômicos, genéticos, mitocondriais, citoplasmáticos e fatores relacionados à senescência celular também são responsáveis por afetar a qualidade dos oócitos na reserva ovariana (PARK; WALSH; BERKOWITZ, 2021) (Figura 2).

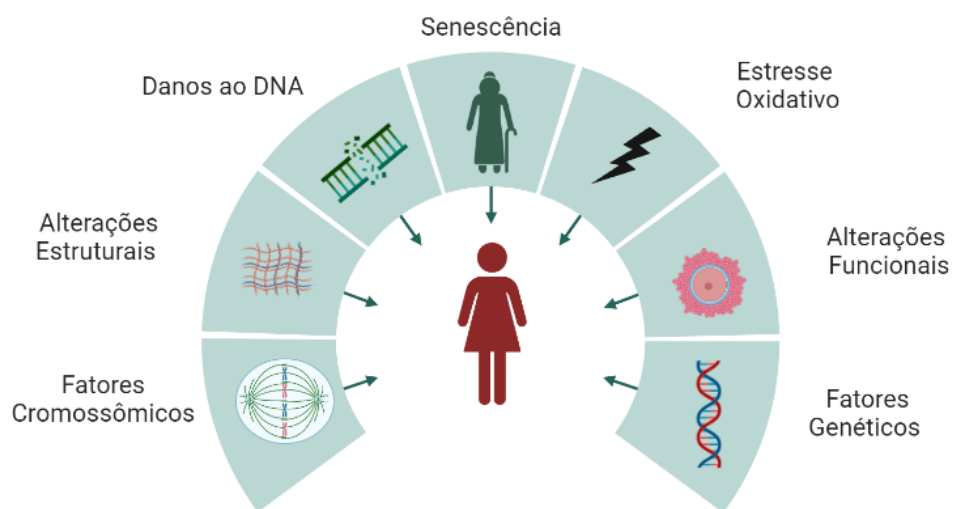


Figura 2: Fatores que podem afetar a qualidade da reserva ovariana. Fonte: Arquivo pessoal.

2.1. Fatores que influenciam a qualidade dos oócitos

O envelhecimento ovariano é responsável por grande parte das alterações que influenciam a qualidade dos oócitos e, conseqüentemente, a infertilidade. Conforme o organismo envelhece, os mecanismos responsáveis por reparar os danos do DNA tornam-se menos eficientes, levando a danos e reparo alterado do DNA, além do acúmulo de mutações. Nos oócitos, esses danos podem resultar em má qualidade, apoptose e, conseqüentemente, infertilidade. O gene *BRCA1* e seu gene supressor de tumor, *BRCA2*, estão envolvidos no reparo da quebra de fita dupla do DNA mediado por ataxia-telangiectasia mutada (*ATM*) em oócitos (LIN et al., 2017; TITUS et al., 2013). Esses genes estão envolvidos na regulação da transcrição dos genes de reparo do DNA através de eventos de hiperfosforilação de quinases enquanto as proteínas codificadas por *BRCA1* e *BRCA2* reparam a quebra da fita dupla por recombinação homóloga (YOSHIDA; MIKI, 2004). O papel do *BRCA1* e *BRCA2* foi estudado no envelhecimento ovariano e foi possível observar que mutações genéticas em camundongos e humanos estão associadas a um declínio na reserva ovariana relacionada a idade (LIN et al., 2017; TITUS et al., 2013).

As vias de sinalização envolvidas na proteção celular contra o estresse oxidativo são cruciais na falência ovariana relacionada à idade (TESARIK; GALÁN-LÁZARO; MENDOZA-TESARIK, 2021). Estudos em camundongos demonstraram um aumento do dano oxidativo relacionado à idade e uma diminuição na expressão de genes antioxidantes (LIM; LUDERER, 2011). Esse dano oxidativo comprometeu o suprimento de ATP e a expressão gênica mitocondrial, essenciais para a diferenciação das células da granulosa durante o desenvolvimento folicular (PIERCE et al., 2013). A instabilidade do DNA mitocondrial também contribui para o acúmulo de mutações no DNA mitocondrial, resultando em uma diminuição na qualidade do oócito (LIM; LUDERER, 2011). Além de desencadear vias apoptóticas nas células da granulosa, o dano mitocondrial reduz a expressão da enzima responsável pela conversão de andrógenos em estrógenos, favorecendo a prevalência de andrógenos nos folículos (PIZARRO et al., 2020). Isso afeta a maturação do oócito (TESARIK; MENDOZA, 1995), explicando como os distúrbios nas vias antioxidantes relacionados à idade podem comprometer a qualidade do oócito (TESARIK; GALÁN-LÁZARO; MENDOZA-TESARIK, 2021).

Os fatores cromossômicos podem influenciar o desenvolvimento dos oócitos, quando a divisão meiótica não acontece de maneira precisa e acontecem erros durante o processo de

segregação cromossômica, levando a aneuploidias e, conseqüentemente, anomalias congênitas e a infertilidade. Para que isso não aconteça, é necessário que as cromátides-irmãs permaneçam juntas até a anáfase, através de complexos multiproteicos que medeiam a coesão entre os braços das cromátides-irmãs e os centrômeros durante a mitose e a meiose, denominadas coesinas (BROOKER; BERKOWITZ, 2014). Estudos demonstraram que o aumento da idade feminina resulta na deterioração natural da coesão cromossômica nos oócitos (CHIANG; SCHULTZ; LAMPSON, 2011; HORNICK et al., 2012; TSUTSUMI et al., 2014). Isso acontece porque as coesinas em oócitos mais velhos são mais suscetíveis à separação, uma protease de cisteína responsável por clivar a subunidade de coesina REC8 (UHLMANN et al., 2000). A clivagem das coesinas leva à diminuição da coesão que, por sua vez, leva a uma maior frequência de segregação incorreta dos cromossomos, a separação antecipada de cromátides-irmãs e, por fim, a aneuploidia (HOLTON et al., 2020).

Devido às constantes alterações que o ovário sofre a cada ciclo reprodutivo, sua estrutura deve-se apresentar de maneira dinâmica e mecanicamente responsiva. Sua estrutura pode ser dividida em três zonas: o epitélio, o córtex e a medula. O córtex é uma região rica em colágeno e apresenta maior rigidez quando comparado com a região medular interna (HORNICK et al., 2012; JORGE et al., 2014). Esse gradiente de rigidez demonstra a dinâmica que existe entre as células ovarianas e o seu microambiente (WOODRUFF; SHEA, 2011). Os folículos primordiais (dormentes) estão localizados no córtex ovariano e essa região oferece um ambiente físico capaz de suportar a arquitetura folicular, desempenhando um papel importante na sobrevivência do folículo, uma vez que a rigidez da MEC limita sua expansão e a maturação do oócito e mantém os folículos quiescentes (SHAH et al., 2018). Conforme os folículos crescem e migram em direção à medula do ovário, encontram uma região menos rígida, o que permite sua expansão e desenvolvimento. Alterações na rigidez da MEC ovariana interferem diretamente no comportamento dos folículos (OUNI et al., 2020) e as mudanças em seus aspectos físicos podem participar de distúrbios ovarianos, como a insuficiência ovariana (WOOD et al., 2015). As mudanças funcionais e estruturais que participam do desenvolvimento folicular, ovulação e subsequente reparo de lesões ovarianas causadas por patologias ao longo da vida reprodutiva altera suas propriedades biomecânicas, o que interfere nas interações entre células e a matriz (URBANCZYK; LAYLAND; SCHENKE-LAYLAND, 2020).

Além dos fatores supracitados, as alterações funcionais como o processo de atresia folicular, que acontece de maneira fisiológica, também é um dos fatores que influencia a vida

reprodutiva feminina. No início da puberdade, os folículos primordiais entram na fase de crescimento, desenvolvem-se em folículos secundários e, eventualmente, em folículos antrais, que podem sofrer atresia (MCGEE; HSUEH, 2000). A cada ciclo menstrual, os folículos antrais que sofrem atresia são degradados para nutrir o folículo dominante (PARK; WALSH; BERKOWITZ, 2021). Este processo pode ser considerado um mecanismo protetor com o objetivo de eliminar oócitos de má qualidade e que não podem ser fecundados, entretanto é responsável pela perda de grande parte dos oócitos (HUNT; HASSOLD, 2008).

É possível observar que a qualidade dos oócitos está intrinsecamente ligada a vários fatores relacionados, principalmente, à funcionalidade ovariana. Uma das maneiras mais eficazes de determinar o estado dos oócitos é por meio da avaliação de sua capacidade de gerar embriões funcionais. Nesse contexto, devido à crescente tendência de adiamento da gravidez, torna-se necessário recorrer a estratégias como a reprodução assistida e a produção *in vitro* de embriões. Além disso, a realização de pesquisas é essencial para buscar tratamentos direcionados para as causas subjacentes da diminuição da reserva ovariana em mulheres com alterações ovarianas, aumentando assim as perspectivas de alcançar a gravidez.

2.2. Reprodução assistida e produção *in vitro* de embriões

A reprodução assistida é composta por um conjunto de técnicas, tecnologias e procedimentos médicos e biomédicos com o objetivo de fertilizar um embrião *in vitro* (CORRÊA; LOYOLA, 2015). Em mamíferos, a fertilização *in vitro* (FIV) refere-se especificamente à união de um óvulo e um espermatozoide fora do organismo. A busca pela realização da FIV e pela subsequente transferência de embriões (TE) teve início na metade do século 20 (JOHNSON, 2019).

A história da FIV e da TE em mamíferos teve início em 1891, com a transferência bem sucedida de dois óvulos fertilizados recuperados de uma coelha angorá para a trompa de falópio de uma lebre belga, gerando descendentes com fenótipo angorá (WALTER HEAPE, 1891). Desde então, vários trabalhos foram conduzidos com o objetivo de melhorar as técnicas de fertilização e o primeiro tratamento bem-sucedido de FIV em humanos aconteceu em 1978 com o nascimento de Louise Joy Brown (JOHNSON, 2019).

A FIV é um procedimento que envolve diversas etapas, sendo considerado tratamento definitivo para a infertilidade prolongada pelo *National Institute for Health and Care Excellence (NICE)* (NICE GUIDELINES. FERTILITY., 2015, [s.d.]). Inicialmente, os

hormônios são utilizados com o objetivo de estimular a produção de óvulos que serão coletados por meio de aspiração folicular transvaginal, guiado por ultrassonografia (*Ovum pick-up* - OPU), considerada menos agressiva quando comparada a técnicas com à laparotomia ou à laparoscopia (SANTL et al., 1998). Após a realização da OPU, os embriões são produzidos em laboratório mediante a fusão dos oócitos viáveis e espermatozoides por meio da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Posteriormente, os embriões são submetidos a um processo de cultivo por alguns dias antes de serem inseridos no útero, utilizando-se da técnica de transferência de embriões frescos. Os embriões excedentes geralmente são criopreservados com a finalidade de transferência futura, caso a transferência inicial não resulte em gravidez (MAHESHWARI et al., 2018) (Figura 3).

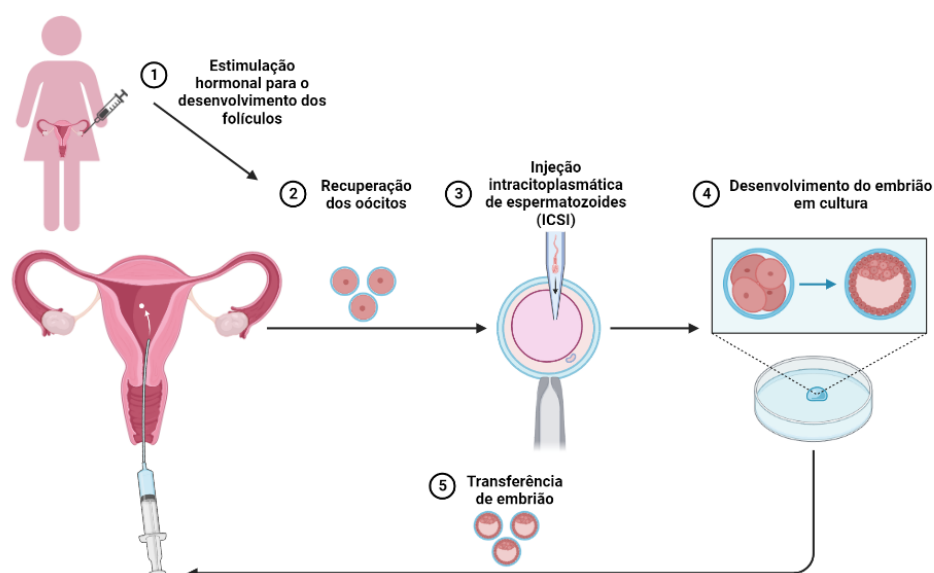


Figura 4: Etapas da fertilização *in vitro*. Fonte: Arquivo pessoal.

No entanto, apesar dos avanços tecnológicos, as taxas de sucesso da FIV permanecem abaixo do desejado, com uma taxa geral de nascidos vivos de 25% por ciclo de tratamento (MAHESHWARI et al., 2019). Embora seja reconhecida como uma abordagem eficaz para aumentar as chances de concepção e seja considerada o tratamento definitivo para casais com infertilidade de longa duração, ainda não há tratamentos direcionados às causas subjacentes da infertilidade, particularmente no que diz respeito à diminuição da reserva folicular ovariana. Portanto, é necessário investigar e desenvolver novas técnicas e metodologias que possam melhorar a saúde ovariana, especialmente dentro do contexto da medicina regenerativa.

3. Medicina Regenerativa

A medicina regenerativa consiste em criar condições ideais para o reparo, regeneração e/ou substituição de tecidos lesionados, a fim de restabelecer ou estabelecer a sua função (IISMAA et al., 2018). Baseia-se em três estratégias principais para controlar e ampliar a capacidade regenerativa de tecidos e órgãos: a bioengenharia, o uso de terapias celulares e uso de fatores solúveis (Figura 4). O campo da engenharia de tecido contribui com o uso de arcabouços (do inglês, *scaffolds*) biocompatíveis para substituição do tecido lesionado ou um arcabouço indutor que promova o processo de regeneração celular. As terapias celulares consistem no uso de células para fins terapêuticos que podem ser promovidos por meio de processos tróficos ou pela substituição celular. Vários tipos celulares podem ser usados na terapia, incluindo células-tronco, células progenitoras ou células terminalmente diferenciadas (BUZHOR et al., 2014).

De forma geral, as células também podem regular as funções biológicas por meio de mecanismos dependentes e independentes de contato. Os processos parácrinos ocorrem através da liberação de substâncias que, coletivamente, são denominados de secretoma, podendo ser dividido em duas frações distintas: a fração solúvel, composta por proteínas e citocinas, já muito bem caracterizada, e a fração vesicular, composta por exossomos, microvesículas e corpos apoptóticos. A fração vesicular é composta por ácidos nucleicos e pequenas proteínas que são secretadas para o meio extracelular e pode representar uma alternativa à terapia celular.

A renovação e a regeneração são controladas por muitas classes de agentes bioativos solúveis, variando entre neurotransmissores, peptídeos, quimiocinas, citocinas, fatores de crescimento, entre outros. Em conjunto, essas moléculas são responsáveis pelos sinais necessários para apoiar a homeostase do tecido e o processo de reparo tecidual (KULEBYAKIN; NIMIRITSKY; MAKAREVICH, 2020). Os fatores de crescimento são proteínas solúveis, derivadas de células como macrófagos e fibroblastos, que podem participar do crescimento celular, proliferação, diferenciação, migração e adesão celular através de ligações específicas com os receptores da membrana celular (DUNCAN; KOBAYASHI; SHIMIZU, 2018; ZHANG; ALEXANDER; WANG, 2017). Esses fatores apresentam aplicações importantes em processos de cicatrização de feridas, engenharia de tecido da pele, cartilagem e tecidos ósseos (FERNÁNDEZ-LÁZARO et al., 2019). Os fatores de crescimento apresentam características biológicas específicas, por exemplo, as famílias do fator de crescimento endotelial vascular (*Vascular Endothelial Growth Factor - VEGF*), o fator de crescimento de fibroblastos (do inglês, *fibroblast growth factor*, FGF) e o fator de crescimento

do tecido conjuntivo (*Connective Tissue Growth Factor*, CTGF) podem auxiliar na promoção de migração celular e proliferação de células endoteliais; o fator de crescimento derivado de plaquetas estimula a adesão de pericitos a maturação dos vasos sanguíneos, incluindo o recrutamento de células-tronco (CHEN et al., 2020; HELLBERG; ÖSTMAN; HELDIN, 2010). Além de facilitar a proliferação e diferenciação celular, os fatores de crescimento participam dos processos de regulação da imunidade, regulação hematopoiética, cicatrização de feridas, angiogênese, morfogênese e formação de embriões (ARISAKA; YUI, 2019).

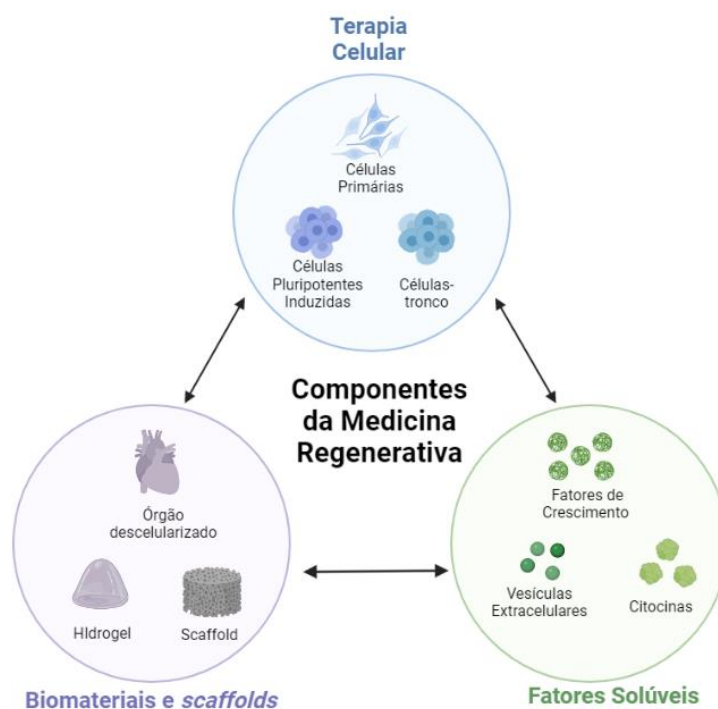


Figura 4: Componentes da medicina regenerativa. Fonte: Arquivo pessoal.

3.1. Células-tronco

Definidas como células que apresentam potencial de auto renovação e diferenciação celular (TILL; MCCULLOCH, 1980; WEISSMAN, 2000), as células-tronco são responsáveis pelo desenvolvimento, renovação e regeneração de tecido e órgãos, além de estarem presentes de forma indiferenciada em diversos tecidos adultos.

O desenvolvimento dos mamíferos se inicia com a formação do zigoto. Após a fertilização do oócito, há a formação do blastocisto, composto por células externas do trofoblasto, que contribui para a formação da placenta e anexos embrionários, e por uma massa interna de células denominadas de células-tronco embrionárias que darão origem às camadas

germinativas do embrião (endoderma, mesoderma e ectoderma), responsáveis pela formação dos órgãos e tecidos que irão compor o indivíduo adulto. Parte das células progenitoras não se diferenciam completamente e se mantêm indiferenciadas como células-tronco teciduais que podem ser encontradas em ossos, medula óssea, sangue, músculo, fígado, cérebro, tecido adiposo e pele, e podem se proliferar diante de lesões (FALANGA, 2012; LAJTHA, 1967; VATS et al., 2005) (Figura 5), sendo classificadas com base na sua origem e capacidade de diferenciação.

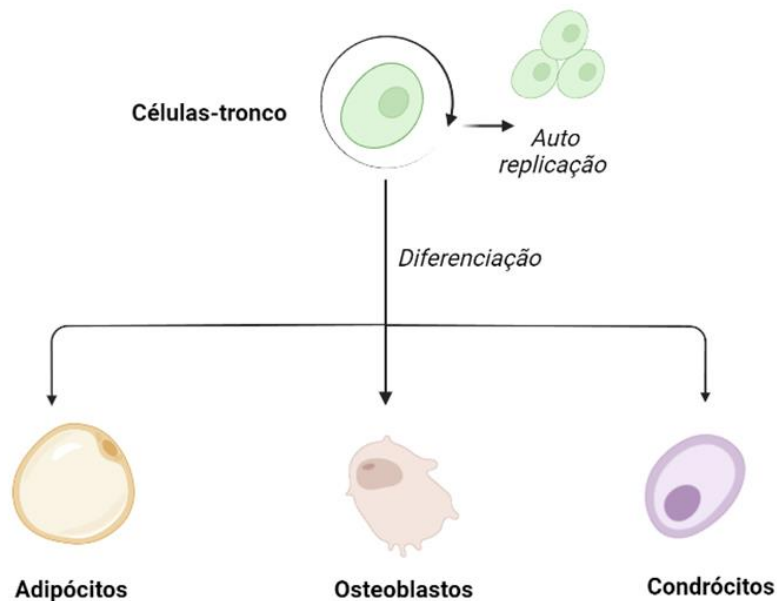


Figura 5: As células-tronco apresentam potencial de auto replicação e diferenciação celular.
Fonte: Arquivo pessoal.

3.2. Classificação das células-tronco quanto ao potencial de diferenciação

A capacidade de diferenciação pode variar entre as células-tronco dependendo da sua origem. Dessa forma, elas podem ser agrupadas de acordo com seu potencial de diferenciação em totipotente ou onipotentes, pluripotentes, multipotentes, oligopotentes e unipotentes.

As células capazes de se dividir e se diferenciarem em todas as células do organismo, apresentando o maior potencial de diferenciação celular são denominadas células-tronco totipotentes e participam do processo de formação de estruturas embrionárias e extraembrionárias. Posteriormente, essas células podem se desenvolver em qualquer das três camadas germinativas ou formar a placenta e outros anexos embrionários. Estas células perdem

a totipotência após a formação da mórula e as células das camadas internas tornam-se pluripotentes (ZAKRZEWSKI et al., 2019).

As células pluripotentes são capazes de formar todas as camadas germinativas, entretanto, não participam da formação das estruturas extraembrionárias, como a placenta (ZAKRZEWSKI et al., 2019). As células-tronco embrionárias, encontradas na massa interna de embriões pré-implantados e as células-tronco pluripotente induzidas, produzidas artificialmente a partir de células somáticas são consideradas pluripotentes (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006).

As células-tronco que apresentam a capacidade de diferenciação mais reduzida, se diferenciando apenas em linhagens celulares mais específicas são denominadas células-tronco multipotentes. As células-tronco mesenquimais, encontradas em uma grande variedade de tecidos, como medula óssea, tecido adiposo, sangue periférico e sangue do cordão umbilical apresentam capacidade de se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condrócitos e por isso são consideradas como multipotentes (AUGELLO; KURTH; DE BARI, 2010; BRUDER; JAISWAL; HAYNESWORTH, 1997; FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970; PROCKOP, 1997).

Já as células-tronco capazes de se autorrenovar e formar duas ou mais linhagens dentro de um tecido específico são denominadas células-tronco oligopotentes, enquanto que as células-tronco unipotentes são capazes de se diferenciar em apenas um tipo celular específico, como células-tronco musculares (BENTZINGER et al., 2013).

3.3. Classificação das células-tronco com base na origem

Durante os primeiros sete dias após a fecundação do óvulo, o embrião se desenvolve, partindo de um zigoto fertilizado, para uma estrutura denominada blastocisto. Inicialmente essa estrutura é composta por uma massa interna de células denominada epiblasto (que compõem a parte superior do disco embrionário) que, posteriormente originará o hipoblasto (precursor do saco vitelino) e o trofotoderma (camada celular responsável por delimitar a parte externa do blastocisto), este último, responsável pela formação dos anexos embrionários. As células-tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna dos blastocistos e sua pluripotência permite que elas se diferenciem em qualquer célula do organismo durante o processo de embriogênese, formando as camadas germinativas que dará origem a células e tecidos diferenciados do feto e, posteriormente, o organismo adulto (LARIJANI et al., 2012).

As células-tronco pluripotentes induzidas são produzidas artificialmente a partir de células somáticas adultas e surgiram devido às dificuldades éticas em relação ao uso de embriões para o isolamento de células-tronco embrionárias (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Até o desenvolvimento de protocolos de reprogramação modernos, a indução de pluripotência, as células somáticas adultas poderiam ser geneticamente reprogramadas com a transferência do seu conteúdo nuclear para oócitos enucleados (WILMUT et al., 1997), ou por fusão com células-tronco embrionárias (COWAN et al., 2005; TADA et al., 2001), processos que demonstravam que óvulos não fertilizados e células-tronco embrionárias possuíam fatores que poderiam conferir totipotência ou pluripotência para as células somáticas. Estes protocolos, porém, eram altamente ineficientes, e frequentemente levavam a células tetraplóides. Diante disso, Takahashi e Yamanaka levantaram a hipótese de que os fatores que desempenham papéis importantes nas características das células-tronco embrionárias também poderiam desempenhar funções importantes no processo de indução de pluripotência das células somáticas. Em 2006, esses pesquisadores encontraram quatro fatores de transcrição que, usados em conjunto, foram capazes de reprogramar fibroblastos adultos em células-tronco induzidas, incluindo o fator de transcrição de ligação de octâmero 3/4 (Oct3/4), fator 4 semelhante a Kruppel (KLF4), SOX2 e mielocitomatose celular (c-Myc) (TAKAHASHI; YAMANAKA, 2006). Um ano depois, em 2007, os mesmos pesquisadores descreveram a geração de células-tronco induzidas humanas a partir de fibroblastos dérmicos humanos adultos com os mesmos quatro fatores. Eles demonstraram que essas células eram semelhantes às células-tronco embrionárias em termos de morfologia, capacidade proliferativa, antígenos de superfície, expressão gênica e potencial de diferenciação (TAKAHASHI et al., 2007).

Células-troncos neurais (CTN) são células auto renováveis e multipotentes que se diferenciam em várias linhagens celulares como neurônios, astrócitos e oligodendrócitos. Esse tipo de célula-tronco se distribui por todo o cérebro em desenvolvimento e residem em dois nichos neurogênicos, a zona subventricular e a zona subgranular no cérebro adulto. As células-tronco neurais se mantêm quiescentes e tornam-se ativas para participar do processo de reparo cerebral (GROCHOWSKI; RADZIKOWSKA; MACIEJEWSKI, 2018). As CTNs adultas têm a capacidade de influenciar a vasculatura através da ativação dos pericitos, mediada pela liberação de substâncias vasodilatadoras, resultando no aumento do fluxo sanguíneo (LACAR et al., 2012). Além disso, essas células podem interagir entre si por meio de junções comunicantes e expressar o receptor do fator de crescimento endotelial vascular, o que promove a ativação das CTN (HAN et al., 2015; KUNZE et al., 2009).

As CTMs podem ser isoladas de vários tecidos, como o cordão umbilical, a medula óssea e o tecido adiposo, além de serem residentes em quase todos os órgãos adultos (MAZINI et al., 2020). Alguns estudos indicam que as CTMs se assemelham a pericitos e emergem da região do estroma periférico em volta dos vasos sanguíneos, o que pode esclarecer seu potencial regenerativo em adultos (BLOCKI et al., 2013; CORSELLI et al., 2013). Diante da sua facilidade de isolamento, sua multipotencialidade e sua capacidade de autorrenovação, as CTMs tornaram-se uma opção de tratamento cada vez mais promissora para uma variedade de condições clínicas (SACCHETTI et al., 2007). Assim como as CTMs, as células-tronco hematopoiéticas (CTH) também são células multipotentes e podem ser encontradas na medula óssea, cordão umbilical e sangue periférico e são responsáveis pela produção contínua de todas as células sanguíneas do organismo, como glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas. Devido a essa propriedade, as CTH podem ser utilizadas em transplantes de células-tronco hematopoiéticas para o tratamento de doenças do sangue, como leucemias, linfomas e anemias aplásticas (DOMINICI et al., 2006).

3.4. Aspectos básicos das CTMs e mecanismos de ação terapêutica

Desde a descoberta de células fibroblastoides aderentes ao plástico derivadas da medula óssea na década de 1970 (FRIEDENSTEIN; CHAILAKHJAN; LALYKINA, 1970), populações celulares com características semelhantes também foram isoladas de fontes de tecido adiposo, (AUST et al., 2004), sangue periférico (SMILER; SOLTAN; ALBITAR, 2008), pulmão (GRIFFITHS; BONNET; JANES, 2005), espaços medulares de ossos longos (TULI; LI; TUAN, 2003), fluidos sinoviais (FAN et al., 2009), ligamento periodontal (GAY; CHEN; MACDOUGALL, 2007) e músculo (JACKSON; NESTI; TUAN, 2010), além de serem obtidas da placenta, da parede e do sangue do cordão umbilical (CORRAO et al., 2013; ERICES; CONGET; MINGUELL, 2000; MIAO et al., 2006). Essas células constituem células-tronco multipotentes, denominadas células-tronco mesenquimais e têm sido amplamente investigadas para uma grande variedade de aplicações terapêuticas. Entre as diversas fontes teciduais de CTMs, o tecido adiposo tem se estabelecido como fonte de fácil acesso para a obtenção de células para a medicina regenerativa, uma vez que estas células possuem propriedades de autorrenovação, diferenciação em tecidos e órgão especializados e secreção de fatores tróficos, além de apresentarem maior facilidade de isolamento (por lipoaspiração minimamente invasiva, realizada de forma eletiva por pessoas saudáveis, ou ainda por procedimento simples realizado em animais) (CHOUDHERY et al., 2014).

Até o momento, ainda não há um único biomarcador exclusivo que permita a identificação das CTMs. Dessa forma, com o objetivo de estabelecer critérios de identificação e caracterização das CTMs, a Sociedade Internacional de Terapia Celular (*International Society for Cellular Therapy*) (DOMINICI et al., 2006), definiu um conjunto de critérios fenotípicos e funcionais que permitem a identificação desta população celular, em humanos. Para serem caracterizada como CTMs, as células devem apresentar capacidade de aderência ao plástico, autorrenovação, potencial de diferenciação multipotente (avaliada de acordo com a capacidade da população celular diferenciar-se em adipócitos, osteoblastos e condrócitos), além da expressão de um conjunto de marcadores de superfície como CD44, CD73, CD90 e CD105, associada a uma baixa expressão de CD11b, CD19, CD34, CD45 e o antígeno leucocitário humano-DR (HLA-DR) (PENDLETON et al., 2013) (Figura 6).

Apesar de inicialmente se hipotetizar que as CTMs poderiam ser utilizadas clinicamente para substituir células perdidas em processos de lesão e degeneração tecidual, aos poucos percebeu-se que a ação parácrina destas células era o principal mecanismo associado a melhoras clínicas promovidas por sua aplicação (HONG; KIM; SON, 2012).

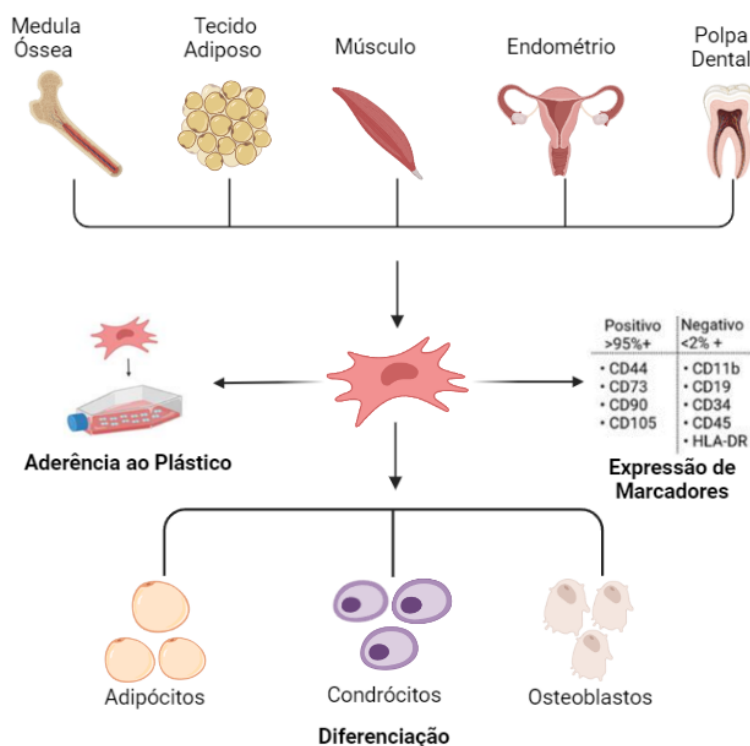


Figura 6: Requisitos para caracterização das populações de CTMs segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular. Adaptado. (DOMINICI et al., 2006).

A ação parácrina de CTMs envolve moléculas solúveis e VEs e promove efeitos predominantemente antiapoptóticos, proliferativos e anti-inflamatórios (CAPLAN; DENNIS, 2006). A capacidade de imunomodulação das CTMs acontece após a incorporação de um fenótipo imunorregulador em resposta à fatores inflamatórios como *IFN-γ*, *IL-1β* ou *TNF-α*, secretados por células imunes ativadas (HOOGDUIJN; LOMBARDO, 2019). Por outro lado, quando os padrões moleculares associados a patógenos são reconhecidos por essas células, a ativação dos receptores *Toll-like* se inicia e promove a expressão de citocinas inflamatórias como *TNF-α* (BAER et al., 1998). Já a capacidade regenerativa das CTMs está associada à sua capacidade funcional de manter um microambiente reparador por meio do contato célula-célula, associado à secreção parácrina de uma variedade de macromoléculas bioativas que são capazes de promover a imunomodulação de células inflamatórias que participam do processo de reparo tecidual, como linfócitos T, macrófagos e mastócitos.

Dentre os fatores tróficos responsáveis pelo seu potencial regenerativo e imunomodulador estão citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas, liberados diretamente no espaço extracelular ou carregados por vesículas extracelulares. Essas características permitem que as CTMs modulem processos de angiogênese, apoptose e proliferação, o que permite que os tecidos lesionados sejam capazes de formar uma resposta regenerativa autorregulada (HONG; KIM; SON, 2012; MARFY-SMITH; CLARKIN, 2017).

3.5. Uso das CTMs na terapia reprodutiva

Com o avanço no entendimento do funcionamento das CTMs, tem havido um crescente interesse na terapia regenerativa no campo da saúde reprodutiva. Estudos utilizando um modelo de falência ovariana induzida por ciclofosfamida em coelhos demonstraram que o tratamento com CTMs foi capaz de restaurar a reserva funcional ovariana e aumentar o número de folículos ovarianos (ABD-ALLAH et al., 2013). Além disso, em modelos experimentais de disfunção ovariana induzida por quimioterapia em camundongos, a terapia com CTMs mostrou-se capaz de induzir angiogênese e restaurar o número de folículos ovarianos em ovários danificados (TERRACIANO et al., 2014). Diversos estudos evidenciaram que as CTMs têm o potencial de reduzir a apoptose nas células da granulosa e a fibrose no tecido ovariano, resultando em melhorias na foliculogênese e na recuperação da função ovariana em modelos animais de falência ovariana precoce (MANSHADI et al., 2019).

No tratamento da disfunção ovariana, as células-tronco apresentam a capacidade de migrar diretamente para o ovário lesado e se estabelecer nesse local em resposta a múltiplos estímulos, promovendo a recuperação do ovário (ZHAO et al., 2019). Além disso, essas células têm a capacidade de secretar uma ampla variedade de citocinas e fatores de crescimento, o que lhes confere a habilidade de modular os processos inflamatórios e imunológicos, e, conseqüentemente, mitigar os danos teciduais associados à inflamação (DE OLIVEIRA BRAVO; CARVALHO; SALDANHA-ARAÚJO, 2016; TAKEHARA et al., 2013).

As CTMs têm demonstrado um amplo potencial no tratamento da infertilidade feminina decorrente de diversas causas, conforme evidenciado por estudos em animais. As CTMs autólogas derivadas do tecido adiposo são particularmente vantajosas devido à sua fácil obtenção. No entanto, é importante ressaltar que a maioria dos estudos foi realizada em animais de pequeno porte, havendo uma significativa escassez de pesquisas em modelos animais de grande porte que possam melhor mimetizar a fisiopatologia ovariana da infertilidade feminina humana. Na tabela 1 é possível observar alguns modelos e tratamentos com CTMs para disfunção ovariana.

3.6. Efeito parácrino das CTMs

O efeito parácrino das CTMs foi descrito em 1996 por Haynesworth, ao observar que estas células sintetizavam e secretavam fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que exerciam efeitos significativos nas células próximas a elas (HAYNESWORTH; BABER; CAPLAN, 1996). O secretoma das CTMs é composto por uma variedade de fatores que se unem para atuar em processos de imunomodulação e regeneração, como FGF, fator de crescimento de hepatócitos (do inglês, *hepatocyte growth factor* - *HGF*) e fator de crescimento transformante B1 (TGF-B1). Citocinas como TNF- α e Il-10, e mediadores lipídicos com prostaglandina E2 (PGE2) também estão presentes no secretoma (J. BRAGA OSORIO GOMES SALGADO et al., 2010).

Esses fatores parácrinos encontram-se livremente no ambiente extracelular ou encapsulados em vesículas extracelulares. Dessa forma, estudos demonstram que as VEs produzidas pelas CTMs podem apresentar aplicações em processos de imunomodulação e regeneração (BERNARDO; FIBBE, 2013), tornando as CTMs ainda mais atrativas no contexto de terapias livre de células e medicina regenerativa.

Aplicação de células-tronco mesenquimais no tratamento da disfunção ovariana					
Tipo de CTM	Patologia	Tratamento	Modelo	Resultados	Referências
Células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo	Dano ovariano induzido por Glicosídeos de tripterígio	Estrutura de colágeno	Ratos	Aumento da fertilidade	(SU e colab., 2016)
	Insuficiência ovariana induzida por cisplatina	Injeção local	Ratos	Aumento da função ovariana	(TERRACIANO e colab., 2014)
	Danos causados pela coleta sucessiva de óvulos	Injeção intraovariana	Bovino	Efeitos benéficos na contagem de folículos antrais	(MALARD e colab., 2020)
Células-tronco mesenquimais do cordão umbilical	Ciclofosfamida induzida por falência ovariana prematura	Injeção na veia caudal	Ratos	Aumento do peso ovariano e aumento do estradiol	(WANG e colab., 2013)
	Insuficiência ovariana prematura induzida por quimioterapia	Injeção local	Ratos	Aumento da fertilidade e função ovariana	(MOHAMED, Sara e colab., 2019)
	Perimenopausa ovário	Injeção na veia da cauda	Ratos	Aumento do estradiol e do número de folículos, diminuição do hormônio folículo-estimulante	(LI e colab., 2017)

Tabela 1: Resumo de trabalhos utilizando CTMs de diferentes fontes com o objetivo de recuperação da função ovariana.

4. Vesículas Extracelulares

As VEs são consideradas estruturas membranosas formadas por uma bicamada fosfolipídica e são secretadas por células (THÉRY; OSTROWSKI; SEGURA, 2009). São encontradas, portanto, no ambiente extracelular dos mais diversos tecidos e nos fluidos biológicos. No grupo das VEs incluem-se os exossomos, que se originam do sistema endossomal, as microvesículas, que são desprendidas da membrana plasmática e os corpos apoptóticos (GYÖRGY et al., 2011). Atualmente, as VEs são consideradas como um

mecanismo adicional para a comunicação intercelular e permitem que as células troquem proteínas, lipídeos e material genético (VAN NIEL; D'ANGELO; RAPOSO, 2018).

A classificação das VEs baseia-se em critérios relacionados ao tamanho, biossíntese e o conteúdo após sua liberação no ambiente extracelular, em resposta a estímulos específicos em situações fisiológicas ou patológicas (EL ANDALOUSSI et al., 2013; THÉRY et al., 2018). Os exossomos são definidos como pequenas VEs de 10-100 nm de diâmetro (GYÖRGY et al., 2011) (Figura 7), cuja biossíntese envolve a formação de corpos multivesiculares a partir de uma endocitose primária da membrana plasmática, formando um endossomo precoce (LÖTVALL et al., 2014). A membrana plasmática é capaz de liberar vesículas chamadas de microvesículas em resposta a estímulos ou situações de estresse. Essas microvesículas possuem um diâmetro que varia de 100 a 1000 nanômetros (TANNETTA et al., 2014). Já os corpos apoptóticos são vesículas heterogêneas, com tamanho de 1-5 μm , originadas de processos apoptóticos, contendo organelas e fragmentos nucleares (PAVANI et al., 2017).

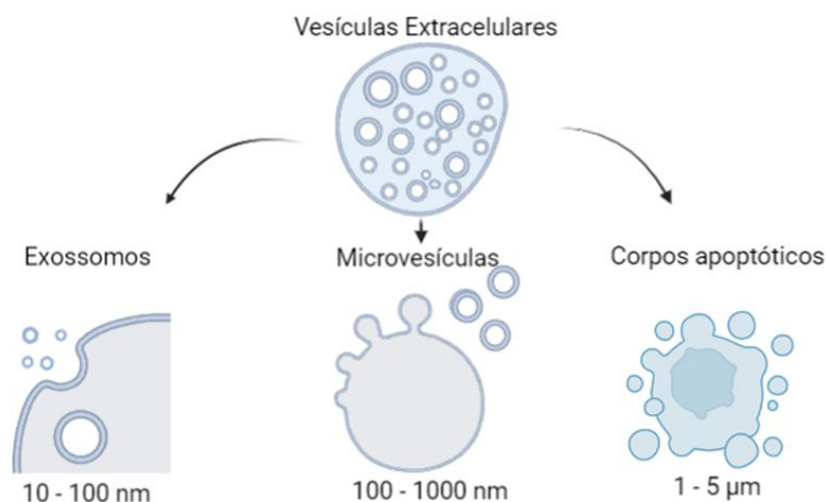


Figura 7: Parâmetros de origem e tamanho das vesículas extracelulares. Adaptado. (GYÖRGY et al., 2011).

No contexto biológico, as microvesículas e os exossomos apresentam grande importância e têm sido amplamente estudados por apresentarem materiais bioativos como proteínas em sua superfície e interior (SIMPSON; JENSEN; LIM, 2008), lipídios (SUBRA et al., 2007), mRNA e microRNAs (VALADI et al., 2007). Essas biomoléculas permitem que as

vesículas participem da modulação celular através de mecanismos de comunicação entre VEs e células-alvo, incluindo a interação entre proteínas de membrana, que ativa a sinalização intracelular dentro da célula-alvo; a transferência do conteúdo de VEs através de fusão com a célula-alvo e, por fim, a fagocitose de vesículas por células receptoras (LÖTVALL et al., 2014). Recentemente, foi descrito ainda que as VEs participam da produção local de mediadores como a adenosina, por meio de proteínas de superfície como CD73 (SCHNEIDER et al., 2021).

As VEs podem ser obtidas a partir de fluidos extracelulares derivados de fluidos corporais ou meios de cultura condicionados por algum tipo celular específico (LÖTVALL et al., 2014). As formas de isolamento das vesículas continuam sendo discutidas, sendo que a metodologia ideal pode variar de acordo com a pesquisa, a aplicação, a pureza e concentração desejada. A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (*International Society for Extracellular Vesicles - ISEV*) é responsável pela padronização dos métodos apropriados para o isolamento e análise das VEs, sendo as técnicas de ultracentrifugação (UC), ultrafiltração (UF), precipitação de polímeros, imunoafinidade e técnicas microfluídicas as mais usadas no processo de isolamento das vesículas (WITWER et al., 2013). A análise dos produtos isolados pode ser feita de forma quantitativa ou qualitativa, através de microscopia de força eletrônica e microscopia atômica para avaliar a morfologia e integridade das VEs, rastreamento óptico de partículas para determinar o tamanho médio, citometria de fluxo para avaliação de marcadores indicativos de concentração e pureza, e *Western blotting* para determinar o teor de proteínas das frações vesiculares (GYÖRGY et al., 2011).

4.1. Biogênese das vesículas extracelulares

Os mecanismos moleculares envolvidos na formação das VEs é um aspecto muito importante para a sua classificação. A biogênese ocorre principalmente por duas vias: a via clássica e pela via direta através do brotamento e fissão da membrana plasmática. A via clássica, responsável pela formação dos exossomos, acontece a partir de um processo de dupla invaginação da membrana plasmática e formação de corpos multivesiculares intercelulares (*Multivesicular Bodies*, MVBs) contendo vesículas intraluminais (ILs). Após a fusão dos MVBs com a membrana plasmática ocorre a liberação das vesículas ILs no meio extracelular, passando a ser chamadas de exossomos (COLOMBO; RAPOSO; THÉRY, 2014).

A formação das vesículas ILs requer dois processos distintos. O primeiro envolve a organização da membrana do endossoma em unidades especializadas, enriquecidas por

proteínas de membranas denominadas tetraspaninas (POLSKA; KLUMPERMAN, 2009). Essa unidade especializada de proteínas de membrana é denominada Microdomínios Enriquecidos com Tetraspanina ou TEMs (*Tetraspanin Enriched Microdomains*) e é responsável em agrupar as proteínas necessárias para a formação de vesículas ILs através dessas interações proteína-proteína. Dentre as tetraspaninas envolvidas no processo de formação dos exossomos, estão CD9 e CD63, que, por sua participação neste processo, podem ser usadas como marcadores de exossomos (JANSEN et al., 2009; KOSAKA et al., 2010). A segunda etapa de formação envolve o Complexo de Classificação Endossomal Requerido para Transporte ou ESCRTs (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) e consiste em quatro complexos multiproteicos necessários para a formação das vesículas ILs. Esses complexos são denominados ESCRT 0, I, II, responsáveis por reconhecer e ubiquitinar proteínas endocitadas na membrana intracelular da vesícula; e ESCRT III (que inclui as proteínas Alix e TSG101), responsável por orquestrar a invaginação de cisão das vesículas ILs para formar os MVBs (BABST et al., 2002; HURLEY; HANSON, 2010; WOLLERT; HURLEY, 2010).

A via direta é responsável pela formação das microvesículas, que acontece por brotamento direto e fissão da membrana plasmática, diferente do modo de biogênese dos exossomos. As microvesículas tendem a ser maiores e sua formação é resultado da interação entre a redistribuição de fosfolipídeos e a contração das proteínas presentes no citoesqueleto que se encontram distribuídas de forma assimétrica na membrana plasmática, sendo reguladas por proteínas responsáveis por transferir os fosfolipídeos, como as flipases e as flopases (BEVERIS et al., 1999; LEVENTIS; GRINSTEIN, 2010; ZWAAL; SCHROIT, 1997). As flipases transferem os fosfolipídios do folheto externo para o folheto interno, enquanto as flopases são responsáveis por transferir os fosfolipídios do folheto interno para o externo. O brotamento é induzido pela translocação de fosfatidilserina para o folheto da membrana externa (HUGEL et al., 2005) e é completado através da contração das estruturas do citoesqueleto por interação da actina-miosina (MCCONNELL et al., 2009; MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010). Os corpos apoptóticos, por sua vez, são estruturas que se formam durante o processo de apoptose.

4.2. Composição das vesículas extracelulares

A composição das VEs está relacionada com o seu processo de formação. A biogênese dos exossomos pode ser usada para compreender o proteoma das vesículas, por exemplo. Uma vez que a formação exossomal e o transporte de MVB são regulados por proteínas do complexo

ESCRT, espera-se que as proteínas Alix e TDG101 sejam encontradas nos exossomos, independentemente do tipo celular de origem, sendo essas proteínas também usadas como marcadores de exossomos, como descrito para CD9 e CD63 (GÉMINARD et al., 2004; THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002; VAN NIEL et al., 2006). Além desses marcadores, vários constituintes celulares de acordo com sua célula de origem, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos compõem as VEs e podem ser liberados por diversos tipos celulares, como células dendríticas, linfócitos, plaquetas, mastócitos, células epiteliais, células endoteliais, neurônios e células-tronco, além de estarem presentes na maioria dos fluidos corporais (THÉRY; ZITVOGEL; AMIGORENA, 2002).

As proteínas mais consistentemente identificadas nos exossomos incluem as transportadoras de membrana e proteínas de fusão, como as GTPase, proteínas de choque térmico, como a HSC70, tetraspaninas, como CD9 e CD63, proteínas de biogênese de MVB, como a Alix e TSG101, fosfolipases relacionadas a lipídeos (CONDE-VANCELLS et al., 2008; SUBRA et al., 2010). A composição lipídica dos exossomos também é complexa e inclui colesterol, esfingolipídeos e fosfolipídeos e já foi analisado em exossomos derivados de células como mastócitos e células dendríticas (LAULAGNIER et al., 2004), reticulócitos (OLVER; VIDAL, 2007) e linfócitos B (WUBBOLTS et al., 2003). Quanto ao conteúdo genético, os fragmentos de RNA e DNA que apresentam comprimento total podem ser transportados para a célula receptora através de endocitose, afetando a produção de proteínas da célula-alvo, o que indica que os exossomos podem portar informações genéticas (LIN et al., 2015).

Os exossomos podem se fundir e liberar seu material nas células receptoras, desempenhando um papel importante na comunicação célula a célula (LAKKARAJU; RODRIGUEZ-BOULAN, 2008; VAN NIEL et al., 2006), apresentando funções variadas de acordo com a sua célula ou tecido de origem. Como são derivados de células em condições fisiológicas e patológicas, tanto as proteínas exossomais quanto os ácidos nucleicos exossomais podem ser considerados como biomarcadores de diagnóstico de várias doenças neurodegenerativas e o câncer (LIN et al., 2015). Da mesma forma que os exossomos derivados de células doentes exercem funções importantes nas doenças, os exossomos derivados de células normais também apresentam significativas funções. Sabe-se que os exossomos funcionam principalmente como transportadores de material celular das células secretoras para modular atividades das células receptoras.

O perfil proteômico das microvesículas é dependente do método de isolamento e há uma categoria de proteínas consideradas como marcadoras que podem encontradas independente da sua origem celular, como resultado da sua biogênese. Como são formadas a partir do brotamento externo da membrana plasmática, as proteínas mais frequentemente identificadas incluem proteínas do citoesqueleto, integrinas e proteínas que contém modificações pós-traducionais, como glicosilação e fosforilação (HEIJNEN et al., 1999; LÖTVALL et al., 2014; MORELLO et al., 2013). A depender das células que secretam, as vesículas podem ser enriquecidas com metaloproteinases e glicoproteínas (DE LIZARRONDO et al., 2012; FALATI et al., 2003; MEZOUAR et al., 2015; MURALIDHARAN-CHARI et al., 2010).

4.3. Vesículas Extracelulares derivadas de CTMs na medicina regenerativa e reprodução

Conforme já foi descrito, parte do mecanismo terapêutico das CTMs é mediado por processos independentes do contato celular, através de fatores solúveis e VEs presentes no secretoma dessas células. As vesículas secretadas pelas CTMs (CTM-VEs) estimulam processos regenerativos por meio de proliferação e migração celular, promovem a indução de angiogênese, protegem as células de apoptose e modulam o sistema imunológico (MAKRIDAKIS; ROUBELAKIS; VLAHOU, 2013). A partir de uma análise proteômica do secretoma das CTMs foi possível identificar diversos fatores de crescimento envolvidos no processo de proteção e regeneração de tecidos (PIRES et al., 2016), além das CTM-VEs serem capazes de estimular a ativação de fibroblastos e a angiogênese em um modelo de cicatrização, durante o reparo tecidual (SHABBIR et al., 2015). As CTM-VEs também são reconhecidas por sua atividade imunológica, pois participam de processos de imunomodulação exercendo controle sobre a proliferação de células T (SEREJO et al., 2019).

Durante o processo de regeneração tecidual, a proliferação e migração celular desempenham um papel crucial na reparação apropriada do tecido danificado (PASTAR et al., 2014) Na fase de proliferação, o foco principal é a recuperação da superfície da lesão, a formação do tecido de granulação e a restauração da rede vascular. Durante esse estágio, ocorre a migração de fibroblastos locais ao longo da rede de fibrina, juntamente com o início do processo de reepitelização das bordas da ferida (REINKE; SORG, 2012). O secretoma das CTMs demonstra a capacidade de estimular a proliferação e migração celular, evidenciando o efeito parácrino dessas células no processo de regeneração (DEVEZA et al., 2013). Em um

estudo realizado, foram utilizadas CTM-VEs em co-cultura com células endoteliais da veia umbilical humana e os resultados demonstraram que essas vesículas foram capazes de estimular a proliferação e migração celular (ZHANG et al., 2018). Além disso, CTM-VEs desempenharam um papel significativo na aceleração do processo de cicatrização de feridas, por meio da ativação da via de sinalização da proteína quinase B (AKT) e estímulo da síntese de colágeno tipo 1 (COL1A1) em fibroblastos estimulados com as VEs (ZHANG et al., 2018).

Assim como no processo de reparo tecidual, vários fatores de crescimento e citocinas presentes no conteúdo das VEs possuem ação terapêutica nos ovários, como o *VEGF*, que atua como um fator de sobrevivência para as células da granulosa e auxilia na prevenção da atresia folicular (KOSAKA et al., 2007) e o fator de crescimento dos hepatócitos (*Hepatocyte Growth Factor - HGF*) que tem sido associada à melhoria da viabilidade dos folículos em crescimento e ao aumento da proliferação do epitélio ovariano, o que favorece a regeneração de regiões danificadas (ITO et al., 2001). Em 2018, um estudo realizado em camundongos demonstrou que a aplicação de CTM-VEs foi capaz de aumentar a taxa de proliferação e diminuir a taxa de apoptose das células da granulosa do ovário para os níveis normais, recuperando a função ovariana através da regulação positiva de SMAD. Esses achados sugerem a possibilidade do uso de VEs como uma terapia mais segura para casos de falência ovariana precoce e melhora da saúde reprodutiva (HUANG et al., 2018).

Portanto, devido a relevância do tema, indubitavelmente, faz-se necessário estudos em outras espécies de animais, uma vez que a fisiologia ovariana de roedores é significativamente diferente da humana.

4.4. Utilização de vacas como modelo animal experimental para a reprodução humana

No contexto atual da medicina reprodutiva, onde a tomada de decisão de ter filhos torna-se cada vez mais tardia e há dificuldades em alcançar a gravidez em mulheres com disfunções ovarianas, a busca de estratégias com o objetivo de aumentar e/ou prolongar a vida reprodutiva das mulheres é relevante e desafiadora. A necessidade de procedimentos invasivos para realizar coletas de material destinados à pesquisa, a grande diversidade genética e de fatores ambientais em pacientes humanos, além das questões éticas envolvidas fazem com que modelos animais sejam necessários. Nesse contexto, os modelos usando roedores são os mais usados em pesquisas básicas e translacionais, devido a fácil disponibilidade, o pequeno porte (que reduz custos e facilita o manejo) e a ampla experiência da comunidade científica.

Entretanto, no que tange o sistema reprodutor feminino, esse modelo animal nem sempre é a escolha mais adequada para a pesquisa, uma vez que não representa com precisão a situação humana.

Dentre os modelos animais usados em pesquisa na área de reprodução, o modelo experimental bovino merece destaque por apresentar dinâmica ovariana mais semelhante ao da espécie humana. De fato, o modelo serviu de base para a descoberta de diversos aspectos relacionados ao sistema reprodutivo humano, por apresentarem semelhanças como o tamanho dos ovários, a duração da gestação, a dinâmica dos folículos e corpos lúteos ovarianos, bem como a fisiopatologia das doenças ovarianas (ROBERTS; JEFF HUANG, 2022). Semelhante ao envelhecimento precoce em mulheres, o envelhecimento em bovinos também está associado a níveis elevados de gonadotrofina e concentrações reduzidas de hormônios esteroidais. Os bovinos apresentam duas ou três ondas de desenvolvimento folicular, na maioria dos ciclos estrais (GINTHER; KASTELIC; KNOF, 1989), e estudos demonstram que boa parte dos ciclos menstruais em mulheres também apresentam duas ou três ondas foliculares (BAERWALD e colab., 2003), além da seleção folicular dominante e a ovulação em um único folículo serem fundamentalmente semelhantes aos padrões ovarianos bovinos (BAERWALD; ADAMS; PIERSON, 2003).

Sob o ponto de vista da medicina veterinária, o conhecimento e desenvolvimento de estratégias de modulação e maximização da fisiologia do sistema reprodutor são também relevantes, uma vez que a produção *in vitro* de embriões é a principal ferramenta para aumentar a produtividade em fêmeas no melhoramento genético de rebanhos. Portanto, a geração de conhecimentos acerca da saúde, patologia, envelhecimento e tratamentos para o sistema reprodutor feminino em bovinos atende duplamente a interesses clínicos na área veterinária, e pré-clínicos na área da medicina humana. Por fim, o modelo bovino é adequado e particularmente útil para pesquisas que buscam esclarecer questões pertinentes à fertilidade da mulher, como fatores relacionados à idade, como desenvolvimento de estratégias para melhorar a estimulação ovariana e a competência oocitária (MALHI; ADAMS; SINGH, 2005).

4.5. Tratamento de lesões ovarianas associadas ao procedimento de OPU utilizando-se CTMs

Como mencionado anteriormente, a aspiração folicular guiada por ultrassonografia é uma abordagem menos invasiva e mais eficaz para a recuperação de oócitos em mulheres e

vacas, resultando em maior número e qualidade de embriões em comparação com a laparoscopia ou laparotomia (SANTL et al., 1998; VIANA et al., 2003). No entanto, repetidas punções podem levar a processos inflamatórios, fibrose e outras condições crônicas que podem resultar em infertilidade precoce adquirida. Portanto, é importante destacar que, apesar de ser uma das melhores técnicas para obtenção de oócitos, a aspiração folicular apresenta riscos, e os animais submetidos a esse procedimento podem ter sua eficiência reprodutiva comprometida, especialmente devido ao uso inadequado da tecnologia.

Recentemente, um em estudo realizado pelo presente grupo de pesquisa (MALARD et al., 2020) demonstrou que as CTMs foram eficientes no tratamento da lesão aguda em vacas sujeitas a punções foliculares ao aumentar a produção de oócitos totais e viáveis levando ao aumento na produção de embriões por sessão de OPU. Considerando os resultados obtidos neste estudo e o potencial terapêutico das CTM-VEs, surgiu o interesse em avaliar o desempenho dessas vesículas na recuperação de oócitos e na produção de embriões em um modelo de lesão aguda em vacas submetidas à OPU. No entanto, antes de abordar a questão principal, surgiram outros questionamentos, como a identificação do método de obtenção que apresenta melhor desempenho para uso *in vivo* em grande escala e se esses métodos possuem potencial diferenciado na modulação de processos associados à regeneração, como a proliferação e migração celular. Antes de abordar a pergunta central sobre o modelo de lesão ovariana *in vivo*, é imprescindível realizar experimentos *in vitro* que proporcionem resultados mais sólidos, a fim de validar a metodologia utilizada para a obtenção das CTM-VEs.

5. JUSTIFICATIVA

A importância da sinalização parácrina entre os mecanismos terapêuticos das CTM foi percebida há alguns anos e tem sido alvo de constantes avanços, inclusive com a ideia de que seria possível substituir o uso de CTMs por seu secretoma para aplicações terapêuticas (PROCKOP, 2007). Considerando a aplicação das VEs como estratégia terapêutica, observam-se claras vantagens em relação ao seu potencial tecnológico quando comparadas à terapia celular. Entre os principais atrativos da substituição das células por componentes do seu secretoma para aplicação tecnológica, destacam-se: menor risco de tumorigenicidade, formação de êmbolos e transmissão de infecções; maior facilidade de avaliação quanto à segurança, dosagem e potência; e menor custo e complexidade de armazenamento (VIZOSO et al., 2017). Por apresentarem várias citocinas e fatores de crescimento em seu conteúdo, é possível que as vesículas apresentem ação terapêutica em ovários lesionados ou de alguma forma disfuncionais.

No entanto, boa parte dos estudos envolvem roedores como modelo animal devido às vantagens quando comparado a outros modelos animais, sendo esse modelo menos adequado para representar o sistema reprodutor humano ao considerar a maturação e fertilização dos oócitos. Diante das vantagens das VEs e o aumento de casos de infertilidade, há a necessidade de novas investigações terapêuticas que visem avaliar o uso de VEs para o tratamento ovariano. Dessa forma, o modelo bovino para estudar o resultado da terapia com as CTM-VEs em ovários pode gerar dados que poderão se transformar em um robusto modelo clínico veterinário e pré-clínico humano.

6. HIPÓTESE:

As CTM-VEs promovem a preservação da função ovariana quanto utilizadas para tratar ovários bovinos lesionados.

7. OBJETIVOS

7.1. Geral: Investigar o potencial terapêutico das CTM-VEs obtidas por ultrafiltração e ultracentrifugação por meio da investigação de seus efeitos sobre a proliferação e migração de células estromais do ovário e seu uso em um modelo *in vivo* de lesão ovariana aguda.

7.2. Específicos:

7.2.1. Isolar e caracterizar as CTMs bovinas;

7.2.2. Isolar as CTM-VEs por ultrafiltração e ultracentrifugação e caracterizar tais frações quanto ao tamanho e número de partículas;

7.2.3. Avaliar o potencial de indução de migração e proliferação celular das CTM-VEs em células obtidas do estroma ovariano bovino;

7.2.4. Avaliar expressão gênica de genes envolvidos no processo de regeneração;

7.2.5. Comparar o rendimento dos métodos de obtenção das CTM-VEs e seus resultados *in vitro*;

7.2.6. Realizar modelo de lesão aguda em vacas nelores e avaliar o efeito do tratamento de ovários lesionados com o uso de CTM-VEs, observando-se a taxa de recuperação de oócitos viáveis e o número de embriões produzidos antes e após a lesão.

8. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) ou da Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA).

8.1. Aprovação em comitê de ética

O presente projeto foi autorizado pelos donos e responsáveis técnicos das fazendas onde os experimentos foram realizados e pelo Conselho de Ética para uso de Animais (CEUA) da Universidade Católica de Brasília (protocolo 003/18).

8.2. Desenho experimental

No estudo 1, avaliamos dois métodos de isolamento de CTM-VEs, UF e UC. Após o isolamento e caracterização das vesículas a partir de CTMs, seu potencial regenerativo foi avaliado por meio de um ensaio de migração com células primárias isoladas do estroma ovariano bovino. Para isso, inicialmente, CTMs de 3 doadores foram isoladas a partir do tecido adiposo bovino e devidamente caracterizadas conforme os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. As VEs foram então isoladas a partir do secretoma de células de 2 destes doadores, por meio das duas metodologias e caracterizadas quanto ao tamanho e concentração de partículas. Após a caracterização, foram realizados os ensaios de avaliação do potencial de indução de migração e proliferação de células do estroma ovariano bovino, obtidas de 3 doadores. Em cada replicata biológica, 200 mil células do estroma ovariano bovino de um doador foram tratadas com meio condicionado ou CTM-VEs obtidas de 20 mil CTMs, estabelecendo-se a proporção do efeito parácrino de células-alvo para CTMs como 10:1, conforme realizado em outros trabalhos da área (SALDANHA-ARAÚJO et al., 2011, 2012).

No estudo 2, o experimento foi dividido em 4 OPUs realizadas em 20 vacas, distribuídas em 4 grupos experimentais (G1, G2, G3 e G4). Inicialmente, CTMs de 3 doadores foram isoladas a partir do tecido adiposo bovino e devidamente caracterizadas conforme os critérios estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular. As VEs foram então isoladas por ultrafiltração a partir do *pool* do secretoma das células destes doadores. Posteriormente, foi realizada uma primeira rodada de OPU (OPU 1) em todos os animais, para avaliar a produção ovariana de cada vaca. Após a OPU, foi realizada uma lesão nos dois ovários de cada animal. Após algumas horas, o grupo G1 recebeu tratamento com o veículo, enquanto os grupos G2-G4 receberam tratamentos experimentais. G2 recebeu a quantidade de vesículas

produzidas por $7,5 \times 10^6$ CTMs, em dose única; G3 recebeu a quantidade de vesículas produzidas por $2,5 \times 10^6$ CTMs, dose única; G4 recebeu 3 doses de vesículas produzidas por $2,5 \times 10^6$ CTMs. Em ambos os grupos, o tratamento foi dividido e administrado nos dois ovários de cada vaca.

As OPUs foram realizadas a cada 14 dias em todos os grupos e apenas o grupo G4 recebeu tratamento com VEs ao final das 2 e 3. Os oócitos coletados em cada OPU foram classificados em viáveis e não viáveis (Figura 8). Os oócitos viáveis foram então fertilizados com uma única partida de sêmen, de touro conhecido e com boa resposta à fecundação. O número e porcentagem de embriões clivados gerados dessa fertilização foi determinado nos grupos experimentais e após sete dias após a fecundação (D7), foi realizada a avaliação da qualidade (morfológica) e quantidade de embriões produzidos a cada grupo.

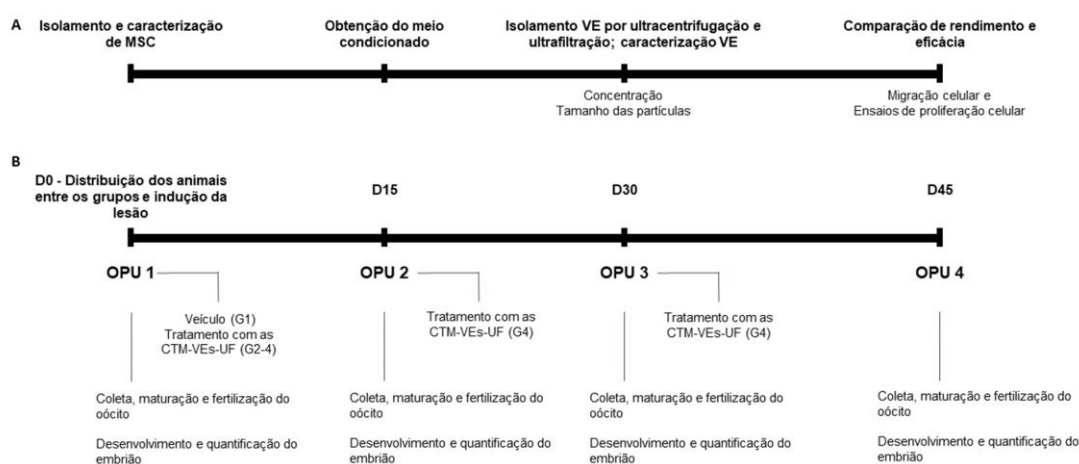


Figura 8: Desenho experimental do estudo *in vitro* (A) e *in vivo* (B). Vinte animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=5), submetidos a 4 sessões de recuperação de oócitos (OPU) e diferentes tratamentos experimentais. G1 (grupo 1): animais submetidos a 4 sessões de OPU e tratados com veículo após OPU 1. G2: animais submetidos a 4 sessões de OPU e tratados após OPU 1 com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais processadas por ultrafiltração (CTM-VEs-UF) em uma dose, correspondente ao número de vesículas produzidas por 7,5 milhões de CTMs. G3: animais submetidos a 4 sessões de OPU e tratados após OPU 1 com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais processadas por ultrafiltração (CTM-VEs-UF) na dose correspondente ao número de vesículas produzidas por 2,5 milhões de CTMs. G3: animais submetidos a 4 sessões de OPU e tratados

após OPU 1, 2 e 3 com vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais processadas por ultrafiltração (UF-MSC-EVs) em dose correspondente ao número de vesículas produzidas por 2,5 milhões de MSCs em cada aplicação.

8.3. Isolamento das CTMs

As CTM foram obtidas através do protocolo padronizado pela empresa Bio Cell Terapia Celular. Brevemente, o tecido adiposo foi coletado de vacas saudáveis após o abate. No laboratório, o tecido adiposo coletado foi lavado em solução tampão fosfato padrão (DMPBS) para retirada dos debris celulares e excesso de sangue. Em seguida, o tecido adiposo foi fragmentado e colocado em contato com a solução de colagenase I e hialuronidase (proporção de 1 ml de tecido adiposo para 1 ml de solução enzimática), por 30 minutos, na temperatura de 38,5 °C para realização da digestão enzimática. O tecido adiposo digerido foi filtrado com filtro de 0,4 µm (Kasvi) para a exclusão de fragmentos de tecido. Após a filtração, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 425g e o pellet celular ressuspensionado em meio de cultura tecidual 199 (TCM 199) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) e solução de Penicilina e Estreptomicina (concentração final 100 U/ml), e plaqueado em garrafas de cultivo de 25 cm² (Corning). As garrafas de cultivo foram mantidas em estufas de cultivo celular à temperatura de 38,5 °C e 5 % de gás carbônico (CO₂). Após sete dias de cultivo, foi realizado o repique celular utilizando-se tripsina-EDTA 0,25% e posterior neutralização da enzima com adição de mesmo volume de SFB. As células foram plaqueadas em densidade de 3,3 x 10³ células/cm² e expandidas até a terceira passagem.

8.4. Imunofenotipagem das CTMs

A caracterização das CTM foi realizada de acordo com a diretriz 131 da sociedade internacional de terapia celular (DOMINICI et al., 2006). A imunofenotipagem foi realizada por citometria de fluxo e quantificação de imagens de Amnis usando superfície positiva para marcadores CD29 (rato anti-humano), CD44 (rato anti-equino), CD105 e as marcações intracelulares de SOX2 e OCT3/4.

8.5. Diferenciação celular

A capacidade de diferenciação das CTM em osteoblastos, condrócitos e adipócitos também foi avaliada, conforme descrito anteriormente (DE FRANCESCO et al., 2015; MARX; SILVEIRA; BEYER NARDI, 2015). Após isolamento e expansão até a 3ª passagem, CTMs dos 3 animais foram induzidas à diferenciação celular para osteoblastos, condrócitos e adipócitos. Resumidamente, as células isoladas foram cultivadas até atingirem 80% de confluência, quando o meio de cultivo foi substituído por meio comercial de diferenciação (condrogênico, adipogênico e osteogênico). A cultura permaneceu por 21 dias com troca de meio a cada 2 dias. Para confirmar a diferenciação celular, as células foram fixadas durante 20 minutos à temperatura ambiente em paraformaldeído a 4% e coradas durante 5 min com Oil Red 1,25% para visualizar gotas lipídicas intracelulares (esperados após diferenciação adipogênica), Alizarin Red a 2% para visualizar depósitos de cálcio (esperados após diferenciação osteogênica) e de azul de Alcian 1% para visualizar as glicosaminoglicanas (esperadas após diferenciação condrogênica). As células coradas foram examinadas de forma qualitativa e documentadas sob microscopia de campo claro.

8.6. Esterilidade das CTMs

Parte das CTMs do lote de células utilizadas no experimento foi descongelada e os testes de presença de micoplasmas, fungos e bactérias foram realizados pelo método reação em cadeia da polimerase (VeritiThermalCycler – Thermo Fischer Scientific). Os testes foram realizados pelo laboratório VETDNA, localizado em Botucatu-SP e os iniciadores utilizados foram desenvolvidos por eles.

8.7. Obtenção do Secretoma das CTM

Para a obtenção do secretoma das CTMs, um total de 5×10^6 CTMs em 3ª passagem foram expandidas em garrafas HYPERFlask em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) sem vermelho de fenol, suplementado com 10% v.v SFB, a 38,5 °C e atmosfera de 5% de CO₂. O meio foi trocado a cada 48 horas até a garrafa atingir 70-80% de confluência antes da última troca de meio, na qual não foi usado SFB. Após 48 horas, o secretoma foi coletado e armazenado em alíquotas a -20°C, as células foram subcultivadas e foi realizada a contagem celular a fim de determinar a quantidade de CTMs que condicionaram o volume de 500 ml de meio.

8.8. Isolamentos das CTM-VEs

O *pool* do secretoma obtido das CTMs de dois doadores foi centrifugado a 300 xg por 10 minutos para remoção de células vivas, centrifugado a 2000 xg para remoção de debris celulares para isolamento das VEs e, por fim, centrifugado a 16500 xg, para remoção de vesículas maiores (>200 nm). Para garantir a remoção de partículas maiores, o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,2 µm de diâmetro (polyethersulfone membrane; Corning) antes do isolamento por UF ou UC, realizado no Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD), coordenado pelo Prof. Dr. Juliano Silveira, da Universidade de São Paulo - Pirassununga.

8.9. Isolamento por Ultrafiltração

Para a obtenção de VEs pelo método de UF, o secretoma (N=2 replicatas; 144 ml/replicata) foi submetido ao filtro *Amicon Ultra-50* (MWCO = 100 kDa; Merck Millipore, Billerica, MA, EUA), conforme descrito por (BENEDIKTER et al., 2017). Resumidamente, o meio foi adicionado ao filtro e centrifugado a 4000 xg a 4°C. Ao final, o pellet enriquecido de VEs foi mantido no volume residual de 200 µl e estocado a -80°C até o transporte e uso.

8.10. Isolamento por ultracentrifugação

Para a obtenção de VEs pelo método de UC, o secretoma (n=2 replicatas; 144 mL/replicata) foi ultracentrifugado duas vezes (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) usando um rotor de ângulo fixo tipo 70Ti-rotor (Beckman-Coulter) a 119700 xg por 70 min a 4°C conforme descrito anteriormente (DE ÁVILA et al., 2020; KENIGSBURG et al., 2017). Após o isolamento das VEs o pellet foi suspenso em 200 uL de tampão fosfato-salino (do inglês *Phosphate-buffered Saline* - PBS) 1X livre de Ca e Mg e estocado a -80°C até o transporte e uso.

8.11. Caracterização das vesículas

A análise das VEs foi realizada utilizando o rastreador das nanopartículas NS300 (NTA Malvern), o qual se baseia em 3 filmagens de 30 segundos cada, o que permite que o software do equipamento calcule o tamanho das partículas e a concentração das amostras por meio do movimento Browniano.

8.12. Grupos experimentais in vitro

Foram estabelecidos grupos experimentais com base na quantificação de vesículas produzidas por 20 mil CTMs. Esses grupos foram denominados de acordo com o método de isolamento, sendo designados como UC e UF. Com o objetivo de evitar que a quantidade de vesículas fosse fator determinante no potencial regenerativo, um grupo adicional de vesículas obtidas por UF foi incluído, contendo o mesmo número de vesículas obtidas por UF e UC. Este grupo foi denominado UF=UC. O meio condicionado utilizado para isolar essa quantidade de vesículas também foi utilizado com grupo experimental.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	
Grupo	Tratamento
UC	1,14 x 10 ⁸ vesículas
UF	6,37 x 10 ⁸ vesículas
UF=UC	1,14 x 10 ⁸ vesículas
Meio Condicionado	114 µl de meio condicionado

Tabela 2: Grupos experimentais com base no número de vesículas produzidas por 20 mil células-tronco mesenquimais bovinas, de acordo com cada método de obtenção e o secretoma utilizado para isolar essa quantidade de vesículas.

8.13. Isolamento das células estromais bovinas

A células estromais bovinas foram enviadas pelo Prof. Dr. Felipe Percin, da Universidade de São Paulo - Pirassununga, de acordo com o seguinte protocolo de isolamento: os ovários de fêmeas bovinas foram obtidos de um abatedouro e mantidos em temperatura ambiente até o momento da manipulação. Os ovários foram lavados em solução fisiológica aquecida previamente e em álcool 70°, de forma intercalada e as células foram isoladas conforme descrito anteriormente, com algumas adaptações (LIU et al., 2022). Resumidamente, em fluxo laminar, os ovários foram lavados novamente, utilizando-se PBS estéril. Uma incisão longitudinal foi realizada para retirada de fragmentos da região estromal (entre folículos) de um

pool de 3 ovários. Estes fragmentos foram lavados em PBS, macerados até serem reduzidos a pedaços de 1-2 mm³ e digeridos em 2 mL de meio α -MEM sem soro com 1 mg/100 μ L de colagenase tipo II durante incubação em tubo de 15 mL a 38,5°C por 2h30min, homogeneizando o tubo a cada 30 minutos.

Após a digestão, a suspensão foi centrifugada a 600 xg por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuspendido em 1 mL de meio de cultivo α -MEM com 10% v.v. de SFB e 0,5% de penicilina, estreptomicina e anfotericina (PSA). As células foram cultivadas em garrafas de 25 cm² com meio de cultivo (4 mL de meio α -MEM suplementado com 10% v.v SFB, 0,5% PSA e 1 mL da suspensão celular) por 6 a 8 dias a 38,5°C e 5% CO₂. A troca de meio foi realizada a cada 48 horas com α -MEM com 10% de SFB e 0,5% PS (sem fungicida) até atingirem a confluência. Células das passagens 2 a 4 foram usadas nos experimentos.

8.14. Ensaio de migração celular

Foi conduzido um ensaio de migração celular para investigar o potencial regenerativo das vesículas. O objetivo do experimento foi mensurar a área aberta após 48 horas de tratamento e compará-la à área inicialmente aberta após arranhadura. Para esse experimento, 2 x 10⁵ células estromais isoladas do estroma ovariano de 3 doadores foram cultivadas em DMEM 10% v.v SFB em placas de 6 poços e, quando atingiram a confluência, foi criado um espaço vazio entre as células (*scratches*) usando uma pipeta de volume de 200 μ l, conforme descrito anteriormente (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Após a realização dos *scratches*, o meio foi retirado, os poços foram lavados com PBS e um novo meio sem adição de SFB foi adicionado. Para o controle positivo, foi adicionado 2% v.v de SFB, o controle negativo não houve adição de SFB nem de tratamentos e os demais grupos receberam os respectivos tratamentos (VE-UC, VE-UF, UF=UC e MC). Essas áreas foram fotodocumentadas no momento zero e após 48 horas, quando as células do grupo controle positivo migraram e fecharam o espaço vazio inicialmente criado. O software *ImageJ* foi utilizado para medir as áreas abertas nos respectivos horários.

8.15. Ensaio de proliferação celular

Para o ensaio de proliferação das células estromais bovinas, as células foram marcadas com 10 μ M de carboxifluoresceína succinimidiléster (CFSE) conforme descrito anteriormente, com algumas adaptações (LI et al., 2018) e 4 x 10⁴ células foram cultivadas em DMEM com seus respectivos tratamentos até o controle positivo atingir a confluência. Para isso, o controle positivo foi tratado com 10% v.v SFB, os demais grupos foram tratados com DMEM 1% v.v

de SFB, sem tratamento (controle negativo) e os demais grupos experimentais (VE-UC, VE-UF, UF=UC e MC). Após a confluência, os poços foram tripsinizados, as células de cada grupo foram contadas, lavadas com PBS e, por fim, foi realizada aquisição de 10.000 eventos dentro da área de interesse, utilizando os canais de FL1 (CFSE-FITC) em citômetro de fluxo Attune® NxT, Acoustic Focusing Cytometer, modelo AFC2, marca Invitrogen, Thermo Fisher Scientific. Os dados foram analisados utilizando-se o software ModFit L, versão 6.0 (LI et al., 2018).

8.16. Cálculo do tempo de duplicação celular

Para a avaliação do tempo de duplicação celular 4×10^4 células foram cultivadas em DMEM com seus respectivos tratamentos até o controle positivo atingir a confluência. Para isso, o controle positivo foi tratado com 10% v.v SFB, os demais grupos foram tratados com DMEM 1% v.v de SFB, sem tratamento (controle negativo) e os demais grupos experimentais (VE-UC, VE-UF, UF=UC e MC). A proliferação celular foi calculada a partir dos dados da contagem das células na seguinte equação: $TD = D \times \text{Log}(2) / \text{Log}(CF) - \text{Log}(CI)$, onde TD = tempo de duplicação em horas; D = duração; CI = concentração inicial e CF = concentração final (CHOE et al., 2017).

8.17. Extração de RNA

Após 48 horas de incubação das células estromais do ovário bovino com os diferentes tratamentos, o RNA total foi obtido. Para tanto, foi adicionado ao pellet celular 1 mL de TRIzol™. As amostras foram vortexadas e mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 494 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 200 µL de clorofórmio (Sigma-Aldrich). As amostras foram vortexadas e mantidas à temperatura ambiente por 10 minutos, em seguida centrifugadas a 4 °C, a 7168 xg por 20 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 ml, adicionado de 1,5 µL de glycoblue (Invitrogen) e 500 µL de isopropanol. A mistura foi vortexada e incubada no gelo por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 16128 xg por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado e o tubo foi centrifugado a 16128 g por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e o pellet de RNA foi mantido à temperatura ambiente até secar. Por fim, as amostras foram ressuspensas em 11 µL de água RNase free, de forma que 1 µl fosse destinado a quantificação (Nanodrop) e até 10 µl a transcrição reversa.

8.18. Síntese de DNA complementar (Transcrição Reversa)

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 800 ng de RNA total, em um volume de 10 µL (completado com água RNase free, quando necessário). Ao RNA, foi adicionado 10 µL do mix preparado com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (Applied Biosystems). Com este kit, para cada amostra a ser sintetizada em cDNA, utilizou-se: 4,2 µL de água RNase free; 2 µL do Buffer RT 10X; 0,8 µL do mix de dNTP 25X; 2 µL de Random Primers RT 10X e 1 µL de MultiScribe™ Reverse Transcriptase. As amostras, em volume final de 20 µL, foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura em um termociclador: 10 minutos a 25 °C; 120 minutos a 37 °C; 5 minutos a 85 °C, 4 °C e armazenadas em freezer a -20 °C até o uso.

8.19. PCR em tempo real

A análise de expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real com o kit Lumina Ct Sybr Green qPCR ReadyMix (Sigma-Aldrich). Com este kit, para cada amostra utilizou-se: 0,9 µL de água RNase free; 5 µL do Lumina S.G; 2 µL de Primer; 0,1 µL de Rox e 2 µL de cDNA. As amostras, em volume final de 10 µL, foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura no equipamento Step One: 2 minutos a 50 °C; 10 minutos a 95 °C; 45 ciclos de 15 segundos a 95°C e 1 minuto a 60 °C. A expressão dos seguintes genes foi avaliada: β-actina, CTGF, COL1A1, AKT e os iniciadores utilizados são apresentados na tabela 3.

Gene	Primer Forward (5'- 3')	Primer Reverse (5'- 3')
B-actina	CGCGACAGGATGCAGAAA	ACGGAGTACTTGCGCTCAG
AKT	TAAAGAAGGAGGTCATCGTGG	CGGGACAGGTGGAAGAAAA
CTGF	AGCTGAGCGAGTTGTGTACC	TCCGAAAATGTAGGGGGCAC
COL1A1	CGAGGAAATGATGGTGCGAC	CTTCACCCTTAGCACCCACAG

Tabela 3: Sequência de iniciadores.

8.20. Animais e Localização

Foram utilizadas vacas Nelore (*Bos taurus indicus*), com idade entre 5 a 6 anos, provenientes de duas fazendas comerciais, uma em Flores de Goiás, GO, e outra em Leopoldina, MG, Brasil. As vacas foram criadas a pasto (principalmente *Brachiaria decumbens*), com alimentação *ad libitum* e acesso à água e suplementos vitamínicos e minerais durante todo

o experimento. As vacas nunca haviam sido manipuladas e foram usadas somente para os experimentos, distribuídas de forma aleatória em cada grupo experimental. Os experimentos *in vivo* foram realizados em parceria com a equipe da empresa Bio Cell Terapia Celular.

8.21. Aspiração folicular guiada por via transvaginal e injeção das CTM-VEs

Os complexos cumulus-oócitos (CCO) foram recuperados através de OPU, seguindo o procedimento descrito anteriormente (VIANA et al., 2010). Resumidamente, todos os folículos com diâmetro maior que 3 mm foram aspirados utilizando um aparelho de ultrassom portátil (Aloka SSD 500, Aloka Co., Tóquio, Japão; ou MyLab 30 Gold, Esaote, Genova, Itália) equipado com um guia de biópsia e agulhas descartáveis de calibre 20 G (WTA, Cravinhos, Brasil). Uma pressão de vácuo entre 80 e 100 mm Hg foi aplicada, e o fluido folicular foi coletado em tubos de 50 mL contendo 15 mL de solução tamponada de fosfato salino Dulbecco (DPBS) suplementada com 1% SFB e 5 UI/mL de heparina sódica.

Os COC recuperados foram classificados com base no número de camadas de células cumulus e na morfologia do citoplasma. Apenas os COC classificados como viáveis foram transferidos para criotubos de 1,2 mL, contendo meio de maturação composto por TCM199 suplementado com 0,05 UI/mL de hormônio folículo-estimulante (FSH), 1 mg/mL de estradiol e 10% SFB. Os COC foram mantidos em uma incubadora portátil a uma temperatura de 38,5 °C até o transporte para o laboratório de desenvolvimento de embriões *in vitro*. O número total e o grau de maturação dos oócitos recuperados de cada doadora foram registrados.

A injeção intraovariana das VEs foi realizada utilizando o mesmo aparelho de ultrassom utilizado na OPU. A ultrassonografia foi utilizada para selecionar três regiões do córtex ovariano, livres de folículos antrais ou corpo lúteo. O volume final de 500 µL contendo as VEs foram administrados nos dois ovários, (50% em cada), distribuídos nos 3 pontos de aplicação.

8.22. Produção *in vitro* de embriões

Os COC maduros foram obtidos após 24 h de incubação a 38,5 °C em atmosfera de 5% CO₂ em ar, utilizando o mesmo meio utilizado para o transporte. COC expandidos foram então lavados e transferidos para meios de fertilização consistindo em piruvato de lactato de albumina de Tyrode (TALP) suplementado com 10 µg/mL de heparina, 20 µM de D-penicilamina, 10 µM de hipotaurina e 1 µM de epinefrina. Para todos os procedimentos de

fertilização, amostras de sêmen congeladas de um único touro de fertilidade comprovada (Aberdeen Angus ou Holandês) foram utilizadas na proporção de 1×10^6 espermatozoides/mL.

Oócitos e espermatozoides foram co-incubados por 20 h a 38,5 °C em incubadora umidificada com 5% de CO₂. Após a co-incubação (dia 0), os zigotos presumidos foram transferidos para gotas de 50 µL de fluido sintético do oviduto (SOFaa) suplementado com aminoácidos essenciais e não essenciais, tricitrato de sódio 0,34 mM, mio-inositol 2,77 mM e FBS a 10% sob óleo mineral. Os zigotos foram cultivados por 7 dias, quando foram avaliadas a produção, estágio de desenvolvimento e qualidade do embrião. Os embriões também foram avaliados no dia 2 (D2) pós-inseminação para clivagem e no dia 7 (D7) para o desenvolvimento do blastocisto.

8.23. Análise estatística

Para os estudos *in vitro*, inicialmente foi realizada a análise de normalidade dos dados por meio do teste de Shapiro-wilk. O teste utilizado para avaliar as diferenças estatísticas entre os grupos foi a análise de variância (ANOVA) sendo utilizado para avaliar os dados de migração, proliferação e qPCR, seguido do teste post hoc Tukey para comparações múltiplas. Para a caracterização das vesículas extracelulares, as médias foram comparadas pelo teste T de *student* pareado. As análises foram consideradas a um intervalo de segurança de 95%, tendo um valor de $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram feitas no GraphPad Prism® Software, versão 7.02 (San Diego, CA, EUA, 2017).

A análise estatística do estudo *in vivo* foi realizada através do Statistical Analysis System (SAS, 1999). Inicialmente, foi realizada uma análise de normalidade para verificar a distribuição dos dados coletados, por meio do teste de Shapiro-Wilk. Como os dados não apresentaram distribuição normal, seguiu-se com análise de variância (ANOVA) não paramétrica de Kruskal-Wallis para comparar os efeitos das VEs entre os grupos experimentais. Para a comparação em pares do tratamento entre as sessões de OPU em cada grupo, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Em todos os testes foram utilizados níveis de significância estatística previamente definidas ($p < 0,05$) para avaliar a significância dos resultados.

9. RESULTADOS

9.1. Isolamento de CTMs, cultivo e caracterização

As CTMs usadas para a obtenção das vesículas foram devidamente isoladas e caracterizadas. As CTMs isoladas a partir do tecido adiposo de 3 vacas saudáveis demonstraram aderência ao plástico durante o processo de cultivo e apresentaram morfologia fibroblastóide. Os resultados de imunofenotipagem por citometria de fluxo confirmaram o perfil mesenquimal das CTMs, conforme sugerido pela Sociedade Internacional de Terapia Celular, demonstrando que estas células expressaram níveis elevados de CD29, CD44 e CD105. Houve também uma alta expressão dos fatores de transcrição SOX-2 e OCT3-4 (Tabela 4).

Animal	Tripla Positivo	Duplo Positivo			Positivo			Tripla (%)	SOX 2 (%)	OCT 3.4 (%)
	CD29/CD44/CD105 (%)	CD29/CD44 (%)	CD29/CD105 (%)	CD44/CD105 (%)	CD29 (%)	CD44 (%)	CD105 (%)			
BOVINO 1	98,54	0,29	0,63	0,18	0,22	0,00	0,11	0,03	87,16	92,89
BOVINO 2	97,74	0,33	0,36	0,59	0,37	0,00	0,38	0,23	89,83	92,08
BOVINO 3	98,87	0,09	0,76	0,12	0,04	0,00	0,05	0,07	91,57	93,93

Tabela 4: Expressão de marcadores utilizados na imunofenotipagem de células-tronco bovinas expresso em porcentagem.

Após os ensaios de diferenciação celular, foi possível observar depósito extracelular de MEC mineralizada, indicativo de diferenciação osteogênica (Figura 9A), e depósito de glicosaminoglicanas, indicativo de diferenciação condrogênica (Figura 9B). Além disso, observou-se deposição intracelular de lipídeos, indicativa de diferenciação adipogênica (Figura 9C), o que demonstra a multipotência das CTMs isoladas a partir do tecido adiposo bovino.

Parte das CTMs foi destinada para testes de esterilidade e foi avaliada quanto à presença de micoplasmas, fungos e bactérias. Os resultados indicaram a ausência dos contaminantes avaliados em todas as amostras.

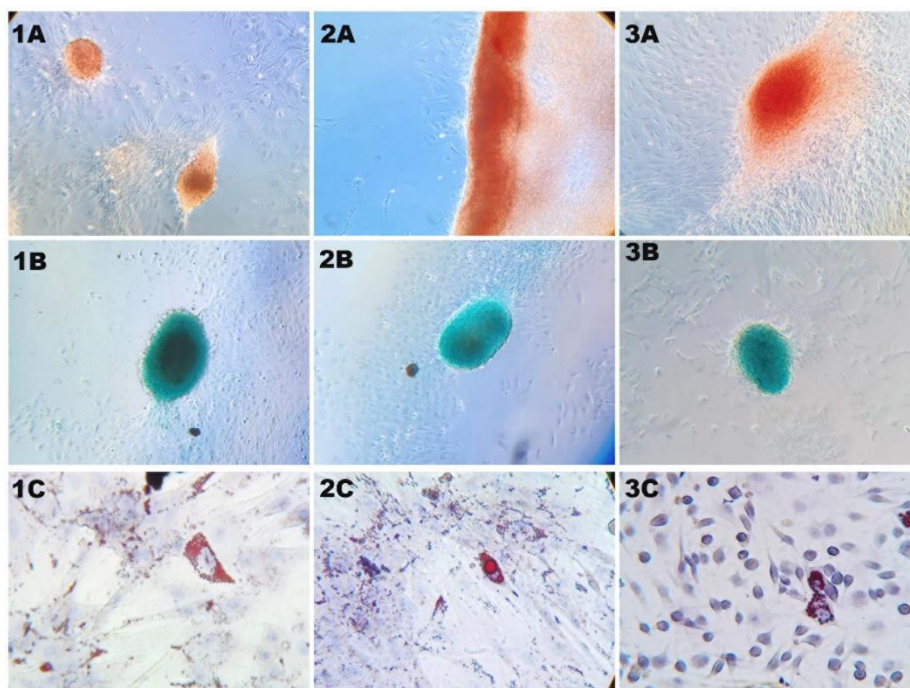


Figura 9: Diferenciação multipotente das células-tronco mesenquimais. As CTMs de 3 doadores (1, 2 e 3) foram diferenciadas pelo período de 21 dias em diferentes meios de diferenciação, fixadas em paraformaldeído a 4% e coradas com vermelho de alizarina para diferenciação osteogênica (A), azul de Alcian para a diferenciação condrogênica (B) e Oil Red para diferenciação adipogênica (C). Aumento de 100x.

9.2. Isolamento e caracterização de CTM-VEs

Cerca de 500 ml de meio condicionado por 100 milhões de CTMs de 2 doadores foi processado para a obtenção das vesículas. Foi realizado um pool com o meio condicionado dos doadores e o volume final foi dividido em 3 isolamentos independentes. As vesículas foram então isoladas e caracterizadas previamente ao uso nos experimentos.

Para análise de rastreamento de partículas, foram processadas um total de 3 amostras derivadas do pool de secretoma de 2 doadores de CTMs para cada método de obtenção das vesículas (UF vs UC). O perfil de distribuição de tamanho e concentração das VEs processadas por UF (Figura 10A) e UC (Figura 10B) demonstrou que a população de vesículas era composta principalmente por VEs de diâmetro aproximado de 200 nm, conforme esperado em amostras enriquecidas para VEs.

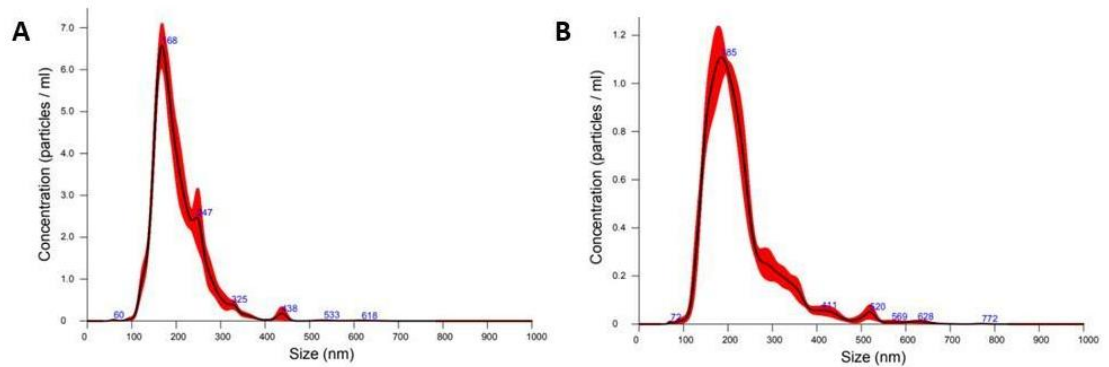


Figura 10: Histogramas representativos da análise de nanopartículas por rastreamento. **A.** Histograma representativo da distribuição da concentração de partículas pelo diâmetro das vesículas obtidas por ultrafiltração. **B.** Histograma representativo da distribuição da concentração de partículas pelo diâmetro das vesículas obtidas por ultracentrifugação.

A concentração média de partículas das amostras isoladas por UF foi de $7,91 \times 10^{11}$, enquanto o isolamento por UC demonstrou concentração média de $1,52 \times 10^{11}$. Assim, o método de UF demonstrou rendimento superior, quando comparado ao método de UC ($p < 0.005$; Figura 11A). Quanto ao tamanho médio das partículas, a análise de rastreamento não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os métodos de obtenção (Figura 11B).

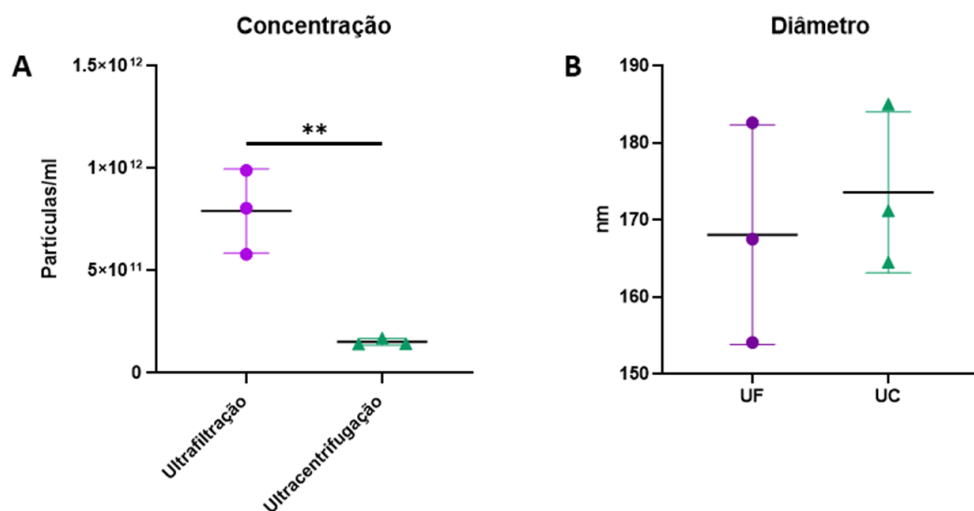


Figura 11: Análise de nanopartículas por rastreamento. **A:** Concentração de partículas obtidas por diferentes métodos de isolamento. **B:** Diâmetro das partículas obtidas pelos métodos de

ultrafiltração e ultracentrifugação. As barras indicam as médias e a barra de erro padrão das médias. As médias foram comparadas pelo teste T de *student* pareado e **** p ≤ 0,01**.

9.3. Capacidade migratória das células estromais tratadas com as CTM-VEs

O experimento realizado demonstrou que as células tratadas com o controle positivo (SFB) fecharam a área aberta pela arranhadura mais rapidamente que os demais grupos experimentais, que consistiram em células estromais tratadas apenas com as CTM-VEs obtidas por UF e UC e o meio condicionado das CTMs sem o estímulo do SFB (Figura 12).

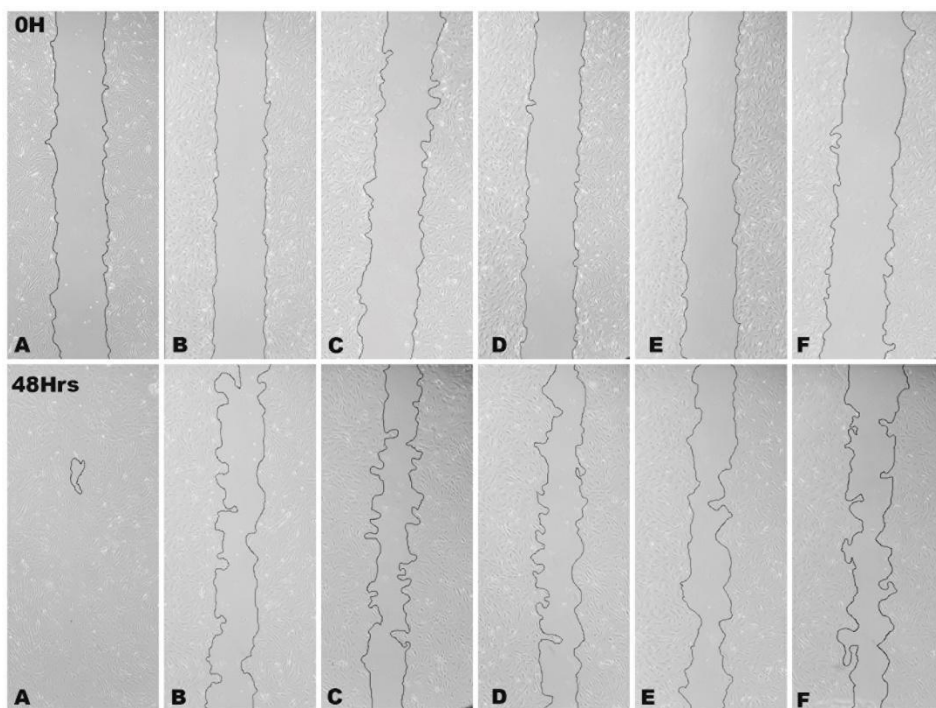


Figura 12: Painel representativo do ensaio de migração celular com células estromais de ovários bovinos. A primeira linha representa 0 h e a segunda 48 hrs de observação após o *scratch*. **A:** controle positivo, tratado com 2% v.v. de SFB; **B:** controle negativo, sem tratamento; **C:** grupo tratado com meio condicionado de CTM; **D:** grupo tratado com VE – UC; **E:** grupo tratado com VE – UF; **F:** grupo UF=UC. Aumento: 10 x.

Os dados foram normalizados de acordo com a área aberta no momento zero. A avaliação da atividade migratória das células estromais demonstrou que tanto as vesículas

obtidas por UF quanto as vesículas obtidas por UC promoveram migração celular superior ao controle negativo do experimento, reduzindo significativamente a área aberta após 48 horas de tratamento (Figura 13). UF=UC e MC não promoveram aumento estatisticamente significativo da capacidade migratória das células nas condições experimentais avaliadas.

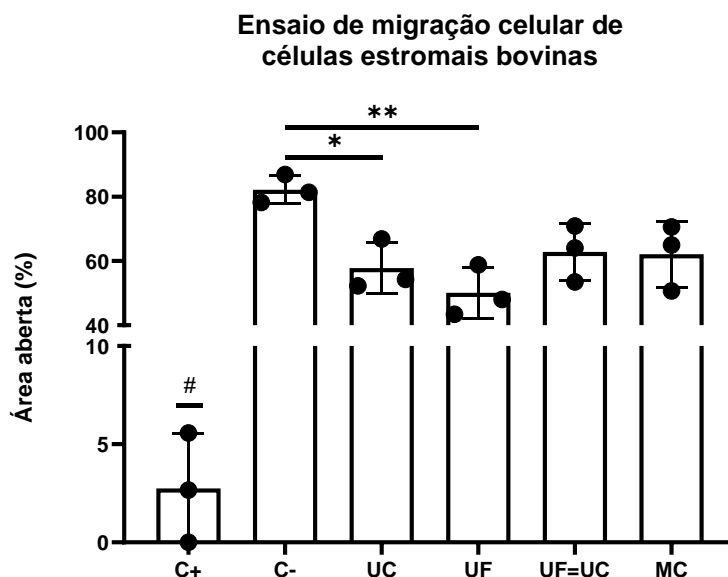


Figura 13: Avaliação da área aberta após 48 horas de tratamento das células estromais bovinas tratadas com SFB (controle positivo - C+), ou sem SFB (controle negativo, C-) e os respectivos tratamentos experimentais. UC: tratamento com CTM-VEs processadas por ultracentrifugação; UF: tratamento com CTM-VEs processadas por ultrafiltração, UF=UC: tratamento com CTM-VEs processadas por ultrafiltração com mesmo número de vesículas do grupo UC, MC: tratamento com meio condicionado das CTMs. Os dados foram normalizados pela área aberta em 0 h. Teste estatístico realizado: ANOVA, seguido de post hoc Tukey. * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ entre os grupos indicados; # controle positivo apresentou diferença estatística quando comparado aos demais grupos analisados.

9.4. Potencial proliferativo das células estromais bovinas tratadas com as CTM-VEs

Seguindo com a avaliação do potencial regenerativo das CTM-VEs, foi realizada uma avaliação da proliferação das células estromais por meio de citometria de fluxo, com marcação celular pelo CFSE e cálculo de tempo médio de duplicação celular. Inicialmente, 4×10^4 foram

marcadas com 10 μ M de CFSE e cultivadas por 96 hs, sob diferentes condições, conforme grupo experimental. O controle negativo consistiu em células mantidas em 1% de SFB, o controle positivo consistiu em células mantidas em 10% de SFB, e os grupos experimentais consistiram em células mantidas em 1% de SFB e tratadas com CTM-VEs processadas por UF, UC, ou ainda UF=UC e MC. Após o período de cultivo, as células foram coletadas, contadas com azul de trypan para cálculo de tempo de duplicação e submetidas a análise por citometria.

A análise de proliferação pela citometria demonstrou que os grupos experimentais não foram capazes de estimular a proliferação celular quando comparados com o controle negativo. A análise das porcentagens de células de diferentes gerações (G2 e G3), foi semelhante ao grupo controle (Figura 14), assim como a porcentagem total de células proliferativas (Figura 15A). No entanto, ao avaliar o tempo de duplicação celular, observou-se que todos os grupos experimentais foram capazes de reduzir o tempo de duplicação celular, quando comparados ao controle negativo do experimento (Figura 15B).

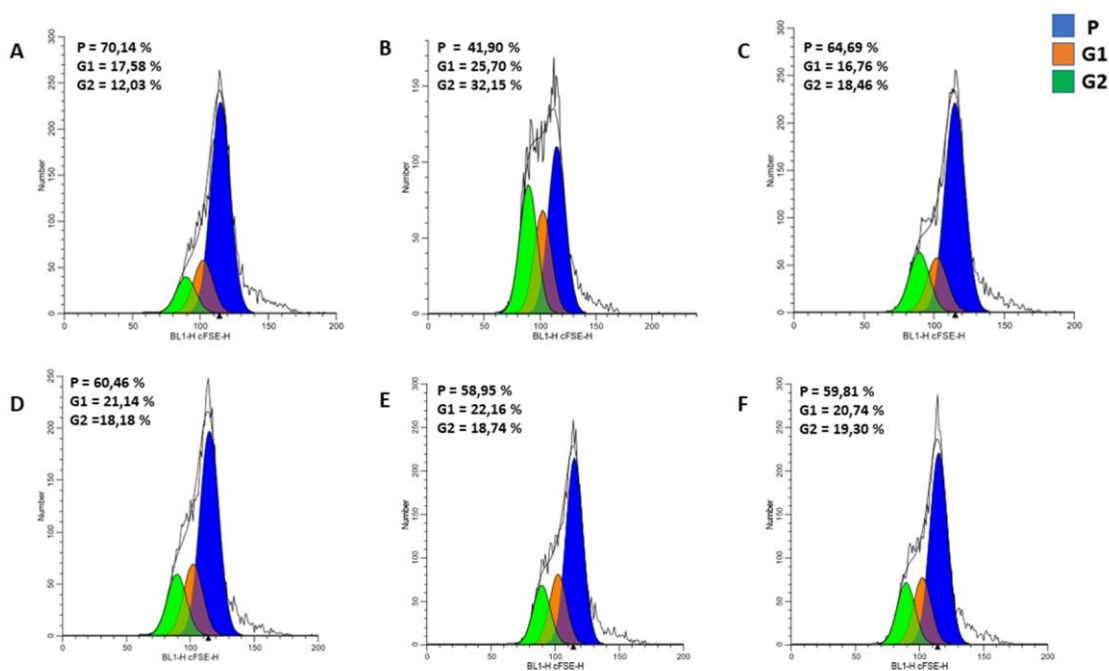


Figura 14: Histogramas representativos da proliferação de células estromais obtidas de ovários bovinos e mantidas em diferentes condições experimentais por 96 horas. A cor azul indica a geração das células parentais; a cor laranja indica as células da população G1 e a cor verde indica a geração de células da população G2 em cada amostra experimental. As populações celulares foram automaticamente classificadas em diferentes gerações pelo software Modfit. A: controle negativo, composto por células mantidas em FBS 1% v.v, sem tratamento; B: controle

positivo, tratado com FBS 10% v.v; C: grupo tratado com FBS 1% v.v e meio condicionado; D: grupo tratado com FBS 1% v.v e VE – UC; E: grupo tratado com 1% vv com VE – UF; F: grupo tratado com 1% v.v FBS UF=UC.

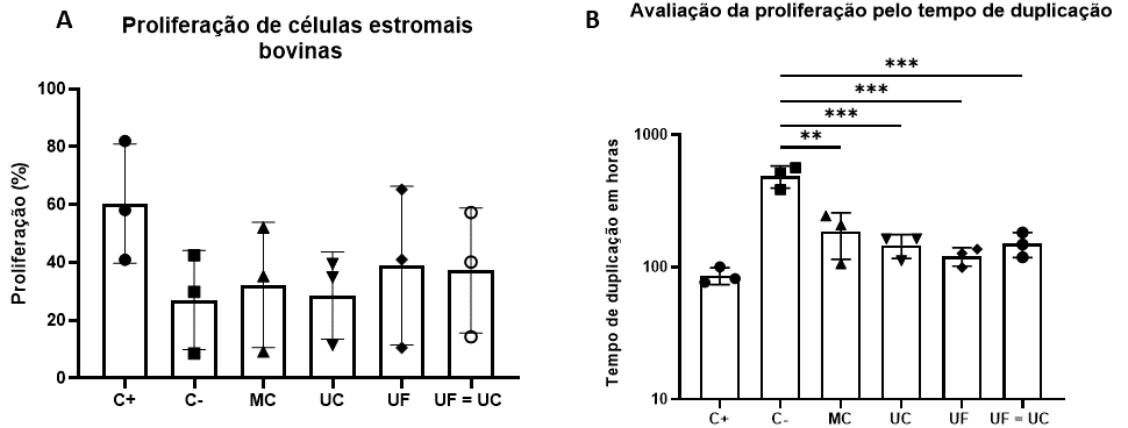


Figura 15: Avaliações de porcentagem de células proliferativas e tempo médio de duplicação de células estromais obtidas de ovários bovinos e mantidas em diferentes condições experimentais por 96 horas. **A:** Porcentagem de proliferação das células estromais do ovário bovino, determinada por citometria de fluxo. A proliferação foi calculada pela média de cada geração após a divisão celular de células marcadas com CFSE. As células estromais bovinas foram mantidas com SFB (controle positivo - C+), ou sem SFB (controle negativo, C-) e os respectivos tratamentos experimentais. UC: tratamento com CTM-VEs processadas por ultracentrifugação; UF: tratamento com CTM-VEs processadas por ultrafiltração, UF=UC: tratamento com CTM-VEs processadas por ultrafiltração com mesmo número de vesículas do grupo UC, MC: tratamento com meio condicionado das CTMs. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. **B:** Tempo médio de duplicação celular após as 96 horas de tratamento. Teste estatístico realizado ANOVA, seguido de post hoc Tukey * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$.

9.5. Avaliação da expressão de genes associados ao processo regenerativo em células do estroma ovariano bovino

Com o intuito de prosseguir com a investigação do potencial regenerativo das vesículas, procedeu-se à extração de RNA das células estromais tratadas no ensaio de migração celular, seguido pela síntese de DNA complementar. Após a transcrição reversa, foi realizada a

avaliação da expressão relativa dos genes AKT, COL1A1 e CTGF. Os resultados obtidos demonstram que os tratamentos realizados não alteraram significativamente o nível de expressão de nenhum dos genes avaliados (Figura 16).

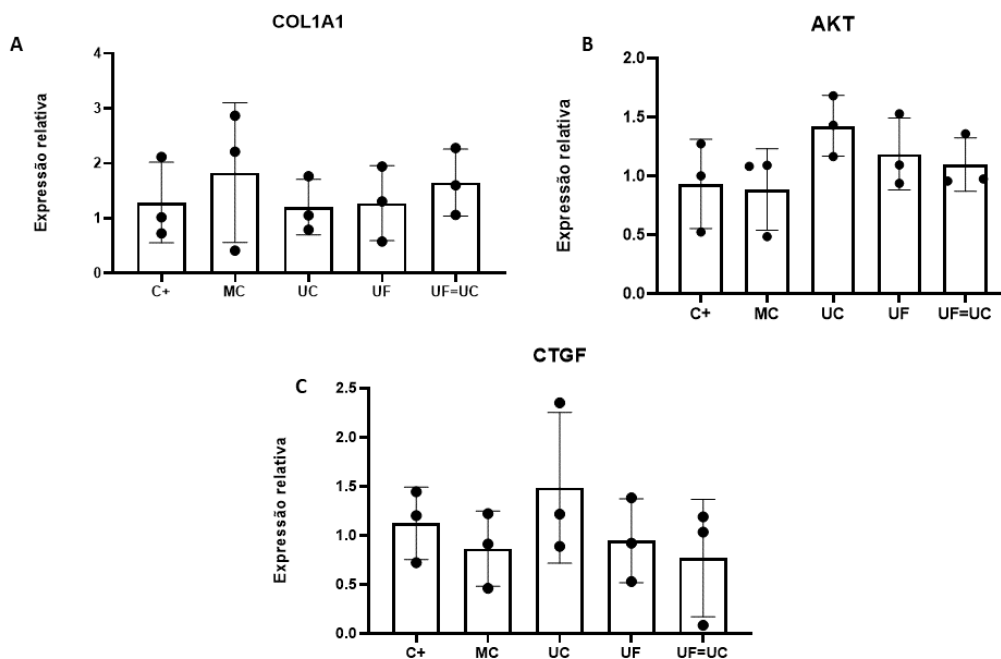


Figura 16: Gráfico representativo da expressão relativa de genes envolvidos no processo de regeneração em células estromais de ovários bovinos, tratadas com meio condicionado das CTMs (MC), as vesículas obtidas por ultrafiltração (UC) e ultracentrifugação (UF), além de UF na mesma dose de UC (UF=UC). (A) níveis de expressão relativa de COL1A1, (B) AKT e (C) CTGF.

9.6. Recuperação de oócitos no modelo de lesão aguda *in vivo*

A análise das estruturas viáveis aspiradas ao final de cada OPU demonstrou que a lesão não resultou em redução significativa na produção de oócitos viáveis entre os grupos experimentais, ao longo das OPUs subsequentes à lesão, mesmo no grupo tratado apenas com veículo (G1) (Figura 17). No entanto, no grupo tratado com a maior dose de vesículas em uma única aplicação (G2), foi observada uma redução significativa na quantidade de oócitos viáveis entre as sessões de OPU (Figura 17B). Embora não tenha sido observada diferença significativa, o grupo tratado com doses fracionadas (G4) demonstrou tendência de manutenção da produção de oócitos viáveis quando comparado aos demais grupos (Figura 17D).

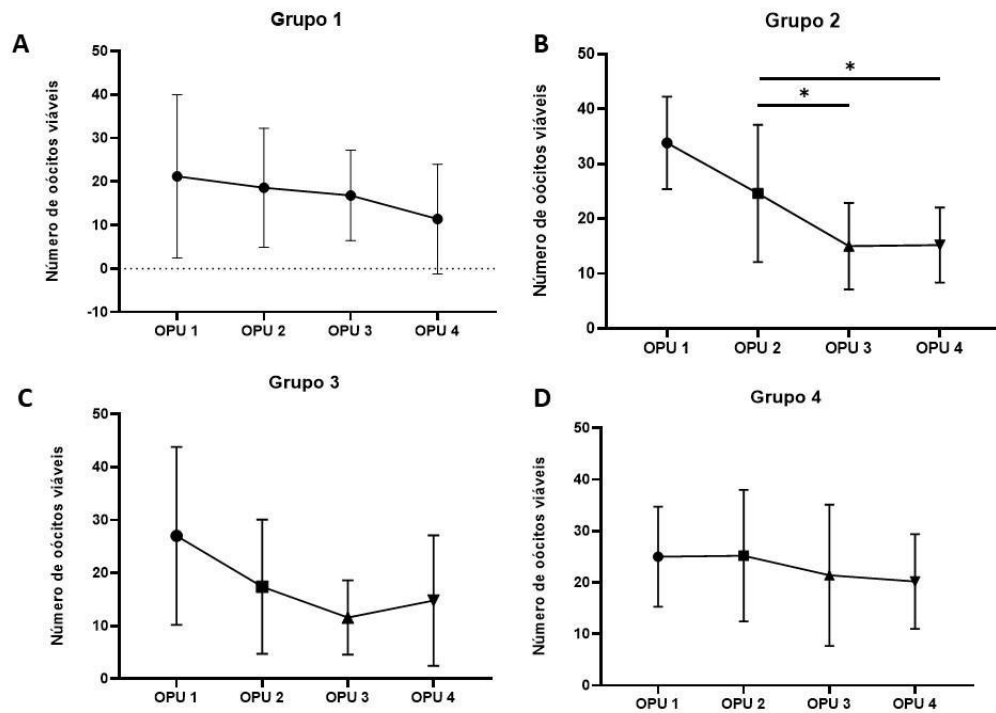


Figura 17: Recuperação de oócitos viáveis após injeção intraovariana de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais bovinas em um modelo de lesão ovariana aguda. Os tratamentos foram realizados de acordo com cada grupo experimental. **G1:** grupo controle; **G2:** VE-UF produzidas por $7,5 \times 10^6$ CTMs, única aplicação; **G3:** produzidas por $2,5 \times 10^6$ CTMs, única aplicação; **G4:** produzidas por $2,5 \times 10^6$ CTMs, três aplicações, com intervalo de 14 dias. * $P < 0,05$.

9.7. Produção *in vitro* de embriões

A capacidade das vesículas em aumentar a produção de embriões *in vitro* foi avaliada em todos os grupos experimentais considerando os seguintes parâmetros: número de zigotos maturados, clivados, produzidos e eclodidos (Figura 18). Os resultados obtidos não demonstraram diferenças significativas entre os grupos experimentais e o grupo controle. No entanto, observou-se diminuição significativa na quantidade de zigotos maturados (Figura 18A) e embriões clivados (Figura 18B) em G2 ao comparar sessões de OPU anteriores e posteriores à lesão induzida na OPU1.

Ao analisar a quantidade de embriões produzidos após cada sessão, de acordo com os grupos experimentais, foi possível observar um aumento na produção de embriões nos grupos 3 e 4, embora esse aumento não tenha atingido significância estatística. Por outro lado, enquanto G1 e G2 apresentaram redução significativa do número de embriões produzidos nas sessões de OPU imediatamente subsequentes à lesão induzida após a OPU 1, os grupos G3 e G4, tratados com diferentes regimes de CTM-VEs, apresentaram preservação da produção de embriões (Figura 18C). Porém, ao se observar o número de embriões eclodidos ao final do tempo de observação, apenas G2 demonstrou diminuir a produção entre as sessões de OPU de maneira estatisticamente significativa (Figura 18D).

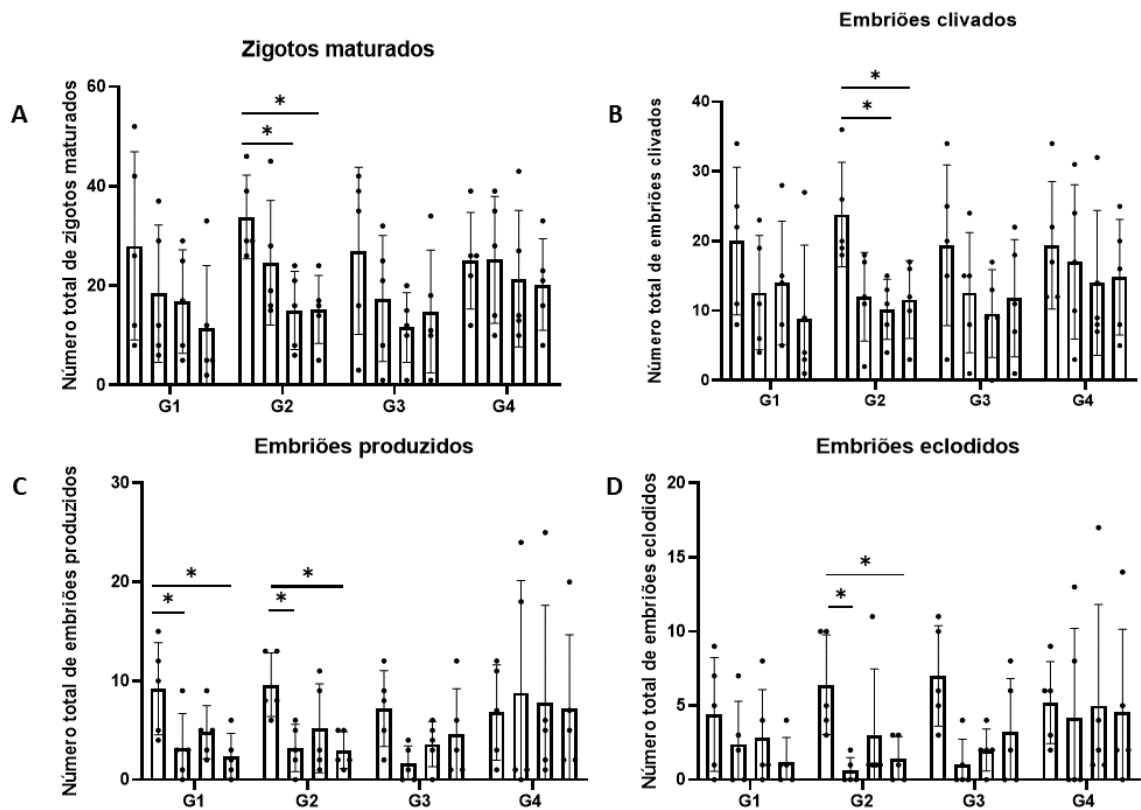


Figura 18: Produção *in vitro* de embriões após injeção intraovariana de vesículas extracelulares derivadas de células-tronco mesenquimais bovinas em um modelo de lesão ovariana aguda. Os tratamentos foram realizados de acordo com cada grupo experimental (G1, G2, G3 e G4) as sessões de OPU estão representadas pelas barras. A produção de embriões foi avaliada quanto ao número de zigotos maturados (A), ao número de embriões clivados (B), número de embriões produzidos (C) e ao número de embriões eclodidos (D) em cada grupo após cada sessão de OPU. *P < 0,05.

10. DISCUSSÃO

Conforme descrito previamente, a aspiração folicular guiada por ultrassonografia é uma etapa essencial à FIV e representa uma abordagem menos invasiva e mais efetiva para a recuperação de oócitos em mulheres e vacas, resultando em maior quantidade e qualidade de embriões em comparação com a laparoscopia ou laparotomia (SANTL et al., 1998; VIANA et al., 2003). Contudo, repetidas punções podem ocasionar processos inflamatórios, fibrose e outras condições crônicas que podem levar a infertilidade adquirida (VIANA et al., 2003). Nesse contexto, as CTMs apresentam eficácia terapêutica em distúrbios imunológicos (BALL et al., 2013) e lesões crônicas (CICCOCIOPPO et al., 2015), o que as torna promissoras para o tratamento de complicações decorrentes de repetidas punções foliculares.

Recentemente, um estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa (MALARD et al., 2020) demonstrou a eficácia do uso intraovariano de CTMs no tratamento de lesões agudas em vacas submetidas a punções foliculares. Tal tratamento resultou no aumento da produção total e viabilidade de oócitos, bem como no aumento da produção de embriões por sessão de OPU. Com base nos resultados deste estudo e no potencial terapêutico CTM-VEs, houve o interesse em avaliar o desempenho dessas vesículas na recuperação de oócitos e na produção de embriões em um modelo de lesão aguda em vacas submetidas a múltiplas OPUs.

No presente estudo, realizamos inicialmente a caracterização das CTMs bovinas e das CTM-VEs por meio de técnicas de UF e UC. Avaliamos as diferentes metodologias de obtenção quanto ao tamanho das partículas, rendimento, capacidade proliferativa e capacidade de migração de células estromais isoladas do tecido ovariano bovino tratadas com as CTM-VEs obtidas por ambas as técnicas. Em seguida, realizamos a primeira avaliação da aplicação intraovariana das CTM-VEs como tratamento para reduzir os efeitos negativos de OPUs em vacas.

O perfil de distribuição de tamanho e concentração das VEs processadas por UF e UC demonstrou que a população de vesículas era composta principalmente por VEs de diâmetro aproximado de 200 nm, conforme esperado em amostras enriquecidas para VEs. A concentração média de partículas das amostras isoladas por UF foi de $7,91 \times 10^{11}$, enquanto o isolamento por UC demonstrou concentração média de $1,52 \times 10^{11}$. O método UF demonstrou um rendimento superior em comparação ao método de UC para a obtenção VEs. Um estudo anterior também relatou resultados semelhantes ao comparar diferentes métodos de obtenção

de VEs. Este estudo avaliou a distribuição de tamanho, rendimento e concentração de proteína nas VEs isoladas utilizando métodos amplamente utilizados, como UF e UC, e os resultados indicaram que todas as preparações de VEs apresentaram tamanho de partículas semelhantes. No entanto, o método de UF obteve um rendimento superior em relação ao método de UC. Observou-se que a diminuição do rendimento estava associada à diminuição na concentração de proteínas, ou seja, o método de UC resultou em menor rendimento e menor concentração de proteínas (ALLELEIN et al., 2021). Embora o presente estudo não tenha apresentado a concentração de proteínas, outros membros do grupo caracterizaram as VEs quanto a esse aspecto, obtendo resultados consistentes com a literatura. Nossa quantificação também demonstrou que o rendimento inferior atribuído ao método de UC pode estar relacionado à baixa concentração de proteínas. É importante destacar que as diversas abordagens de isolamento de VEs podem resultar na obtenção de subpopulações distintas, o que pode influenciar a concentração de proteínas (TAYLOR; SHAH, 2015).

A etapa de quantificação das VEs desempenha um papel fundamental na caracterização dessas estruturas. Embora a quantificação precisa do número de VEs seja desafiadora, é essencial fornecer informações sobre o volume total de meio condicionado ou o número de células utilizadas em cada experimento. A determinação do número de partículas pode ser realizada por meio de tecnologias de dispersão de luz, como a Análise de Rastreamento de Partículas (do inglês *Particle Tracking Analysis* - NTA). Já a quantificação do total de proteínas pode ser realizada utilizando ensaios colorimétricos, como o ensaio de Bradford, ensaios fluorimétricos ou a coloração global de proteínas por SDS-PAGE. No entanto, é importante mencionar que a quantificação dessas proteínas pode levar a uma superestimação devido à presença de contaminantes não relacionados às vesículas. Além disso, é possível quantificar também os lipídios e o RNA total presentes nas VEs (THÉRY et al., 2018).

Devido à considerável heterogeneidade e impureza das populações de VEs resultantes de diferentes métodos de isolamento, não é possível realizar uma quantificação imparcial da quantidade de vesículas por meio dos métodos supracitados. Considerando as aplicações terapêuticas das VEs, a etapa de quantificação assume uma importância significativa na determinação de doses seguras e eficazes para essas aplicações, levando em consideração os aspectos farmacodinâmicos e farmacocinéticos. No entanto, até o momento, não foram estabelecidas diretrizes gerais para a dosagem de VEs (GUPTA; ZICKLER; EL ANDALOUSSI, 2021).

Ainda que a técnica de UC seja amplamente aplicada e demonstre boa pureza (GARDINER et al., 2016), alguns fatores devem ser considerados. Durante o processo de ultracentrifugação foi possível observar a agregação de VEs (LINARES et al., 2015), o que pode afetar o processo de caracterização. A recuperação das VEs por meio de UC também pode ser prejudicada pela dificuldade de ressuspensão do pellet, pois o material pode não ser suficiente para obter um pellet visível (ALLELEIN et al., 2021). Além disso, o isolamento por UC requer o acesso a ultracentrífugas, que não estão amplamente disponíveis em diferentes laboratórios. Apesar de UF se destacar por ser um método conveniente devido à sua simplicidade e rapidez de uso, permitindo obter uma quantidade significativa de partículas em um volume de amostra ajustável com base no fator de concentração (ALLELEIN et al., 2021), é importante ressaltar que a metodologia pode apresentar contaminantes não exossomais, o que pode influenciar na contagem de partículas (WANG et al., 2021). No entanto, quando combinada com métodos como a cromatografia de exclusão de tamanhos, UF pode ser considerada como um método robusto e fácil para isolar VEs, com rendimento e pureza que tendem a ser superiores a UC (BENEDIKTER et al., 2017).

Seguindo com a investigação das CTM-VEs, não houve diferença significativa entre as VEs obtidas pelos dois métodos de isolamento no potencial de migração e proliferação das células estromais derivadas do tecido ovariano bovino. No presente estudo, diferentemente de outros encontrados na literatura, a dosagem das VEs usada para avaliar a capacidade regenerativa das CTMs-VEs se baseou na proporção do efeito parácrino entre CTMs e células-alvo (10:1), enquanto a boa parte dos estudos *in vitro* avaliaram a dose-resposta das VEs. Embora a maioria dos estudos tenha utilizado a UC como método de obtenção das VEs, esses estudos demonstram que as CTM-VEs podem ser internalizados por fibroblastos e otimizados de maneira dependente da dose, promovendo o reparo tecidual por meio da indução de migração e proliferação celular (HU et al., 2016).

Durante o processo de reparo tecidual, a proliferação e migração celular são condições essenciais à regeneração (PASTAR et al., 2014). A análise da capacidade migratória das células é uma abordagem que pode fornecer evidências dos potenciais efeitos regenerativos de um determinado tratamento, uma vez que a migração celular é um dos primeiros eventos que ocorrem durante o processo de regeneração (QU; GUILAK; MAUCK, 2019). Uma das metodologias para analisar a migração celular é por meio do *Scratch assay*, ou ensaio do arranhão, que consiste em realizar um arranhão em uma camada confluyente de células

cultivadas e acompanhar a área aberta ao longo dos dias por meio da fotodocumentação de um mesmo ponto, a fim de verificar as células na borda da ferida migrando para fechá-la (LIANG; PARK; GUAN, 2007).

Parte do estroma ovariano é composto por uma população celular comumente referida como células estromais, geralmente descritas como células fusiformes semelhantes a fibroblastos. A distribuição destas células pode ser diferente de acordo com a sua localização no ovário (córtex ou medula) e pode ser afetada de acordo com as mudanças ao longo de cada ciclo reprodutivo (KINNEAR et al., 2020). Ao longo da vida reprodutiva essas mudanças também podem se tornar mais evidentes, incluindo o aumento do colágeno fibrótico conforme demonstrado no envelhecimento ovariano de roedores e primatas (BRILEY et al., 2016). No geral, estas células participam da produção de colágeno para suporte celular, suporte e reparo tecidual (CANDELARIA et al., 2019). Os resultados obtidos demonstraram que as CTM-VEs foram capazes de induzir a migração destas células, independente da sua forma de obtenção (UF ou UC). No entanto, o ensaio de proliferação celular realizado por meio da marcação com CFSE e análise por citometria de fluxo, não foi possível observar diferenças estatisticamente significativas na proliferação celular. A sensibilidade do ensaio de CFSE é baseada no aumento exponencial do número de células a cada divisão. O número final de células divididas é influenciado pelo número de células precursoras, o número de divisões dessas células e o nível de apoptose das células divididas (MANNERING et al., 2003). Durante um período de 96 horas, as células estromais foram cultivadas em uma placa de 6 poços, proporcionando um curto tempo e uma área limitada para a expansão celular, o que pode ter interferido na análise do ensaio de proliferação.

Conforme já descrito anteriormente, os processos de proliferação e migração celular nem sempre ocorrem simultaneamente (GALLAHER; BROWN; ANDERSON, 2019; YAN et al., 2018). Isso ocorre devido à possibilidade de repressão de algumas vias de sinalização, como a inibição por YB-1, 4E-BP1 e proteínas com habilidades supressoras, o que resulta na falta de coordenação adequada na transição entre proliferação e migração (GALLAHER; BROWN; ANDERSON, 2019). Essa constatação sugere que, embora os processos de proliferação e migração estejam relacionados, não é uma regra que ocorram simultaneamente, especialmente devido às diferenças nas vias de sinalização e nas respostas finais que eles desencadeiam. No entanto, em certos contextos, esses processos podem contribuir para um evento comum (LAUAND, 2016).

Com o objetivo de prosseguir com a investigação da capacidade proliferativa das CTM-VEs, realizamos a avaliação da expressão relativa dos genes COL1A1, AKT e CTGF. Um estudo conduzido em 2018 demonstrou que a terapia livre de células, baseada em CTM-VEs do tecido adiposo, desempenha um papel importante nos processos de cicatrização de feridas, por meio da sinalização de P13K/AKT, além de aumentar os níveis de COL1A1 em fibroblastos após a estimulação com VEs (ZHANG et al., 2018). A AKT desempenha um papel importante em diversas funções celulares, como proliferação celular, progressão do ciclo celular, sobrevivência, metabolismo celular, funções parácrinas e angiogênese (CHANG et al., 2003; SHI et al., 2014), enquanto CTGF é uma proteína de matriz extracelular e participa de muitos processos biológicos, incluído adesão celular, migração e proliferação (CHEN et al., 2020). Portanto, a expressão de AKT está envolvida no processo de reparo tecidual, juntamente com a expressão normal de COL1A1 e CTGF. No entanto, em níveis anormais, a expressão de COL1A1 e CTGF podem contribuir para processos fibróticos devido ao acúmulo patológico de proteínas da matriz extracelular (MEC) em resposta exagerada de cicatrização (NEARY; WATSON; BAUGH, 2015).

Considerando as constantes mudanças estruturais do ovário a cada ciclo reprodutivo, o órgão está sujeito a processos fibróticos que podem prejudicar o desenvolvimento folicular. Além disso, as células estromais isoladas do ovário apresentam características semelhantes às dos fibroblastos, com capacidade de secretar proteínas da MEC e expressão elevada de COL1A1 (WAGNER et al., 2020). No entanto, o tratamento com as CTM-VEs não resultou em alterações significativas nos níveis de expressão de COL1A1, CTGF e AKT nas células estromais, sendo necessárias avaliações de genes mais específicos relacionados aos processos de proliferação celular e fibrose ovariana para obter uma compreensão mais completa desses mecanismos.

Após a análise comparativa das duas formas de obtenção das vesículas (UF vs UC), constatamos que não houve diferença significativa entre elas nos ensaios funcionais, realizados *in vitro*. De acordo com as últimas diretrizes estabelecidas pelas Informações Mínimas para o Estudo de Vesículas Extracelulares (MISEV2018 - *Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018*), não existe um único método ideal para o isolamento de vesículas extracelulares, sendo a escolha baseada nas aplicações subsequentes e nas perguntas científicas específicas do estudo (THÉRY et al., 2018). Nesse contexto, a UF apresenta-se como uma metodologia vantajosa e passível de replicação em larga escala.

Usando o método de UF para a obtenção das vesículas, o presente estudo investigou a injeção intraovariana de CTM-VEs como uma abordagem terapêutica para mitigar os efeitos negativos da OPU em um modelo de lesão aguda em vacas. Inicialmente, as vacas foram divididas em um grupo controle e três grupos experimentais, submetidos a quatro sessões de OPU com intervalo de 14 dias entre elas. Embora tenha ocorrido uma diminuição na produção de oócitos viáveis, não foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais. No entanto, quando avaliado o número de oócitos viáveis recuperados em cada sessão, houve uma redução significativa nas sessões 2 e 3, bem como nas sessões 2 e 4 no grupo que recebeu a maior quantidade de vesículas em uma única dose (G2). Embora sem diferença significativa, o grupo tratado com as três doses de vesículas derivadas de $2,5 \times 10^6$ CTMs (G4) demonstrou manter a produção de oócitos viáveis em comparação com o grupo controle (G1). Quanto ao número de embriões produzidos, apesar de não ter apresentado diferença significativa, o G4 apresentou a maior quantidade de embriões produzidos em comparação com o grupo controle, enquanto o grupo tratado com o maior número de vesículas apresentou diminuição significativa na produção de embriões, o que pode ser explicado devido ao menor número de oócitos viáveis recuperados. Portanto, houve preservação e tendência de aumento do número de embriões produzidos em G4, em contraposição à significativa diminuição no número de embriões produzidos nos grupos G1 e G2.

As doses das VEs foram determinadas com base no número de células utilizadas em um estudo anterior (MALARD et al., 2020), no qual foi realizada a injeção intraovariana de $2,5 \times 10^6$ CTMs em vacas submetidas a múltiplas OPUs. Neste estudo, nosso objetivo foi investigar se a mesma quantidade de CTM-VEs derivadas do mesmo número de CTMs previamente estudadas também poderia reduzir os efeitos negativos das OPUs repetidas. Com base nessa premissa, foram adicionados mais três regimes terapêuticos: a mesma quantidade de vesículas, porém injetada ao final de cada punção, e, por fim, uma dose única com três vezes a quantidade inicialmente definida de CTM-VEs. Apesar de não haver uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais, observou-se um comportamento consistente nos dados que indica um efeito positivo no grupo tratado com as CTM-VEs derivadas de $2,5 \times 10^6$ CTMs em 3 doses. Esse comportamento sugere que pode haver benefícios ou impactos relevantes na recuperação de oócitos viáveis e embriões produzidos. Por mais que o tratamento com as CTMs tenha apresentado resultados superiores (MALARD et al., 2020) e os resultados com as CTM-VEs não tenham alcançado significância estatística, é importante ressaltar que

existem vários fatores que podem ter contribuído para isso, como tamanho da amostra, poder estatístico ou variabilidade intrínseca dos dados.

Considerando a aplicação das CTM-VEs como estratégia terapêutica, observam-se claras vantagens em relação ao seu potencial tecnológico quando comparadas à terapia celular. Devido ao menor risco de tumorigenicidade, maior facilidade de avaliação quanto à segurança, dosagem e potência, e menor custo e complexidade de armazenamento (VIZOSO et al., 2017) as CTM-VEs impactaria positivamente a realidade da prática da FIV na medicina humana e veterinária. Suas vantagens em termos de uso facilitariam a comercialização do tratamento, especialmente considerando a logística envolvida em laboratórios ou fazendas distantes, bem como os custos de transporte e armazenamento. Portanto, é crucial considerar esses resultados preliminares como um ponto de partida e buscar novas abordagens, ajustes metodológicos ou expansão do estudo para obter uma visão mais abrangente quanto ao uso das vesículas e das doses a serem utilizadas.

11. CONCLUSÃO

Este estudo teve como objetivo investigar o potencial terapêutico CTM-VEs, obtidas por duas metodologias distintas: UC e UF. Os efeitos dessas VEs na proliferação e migração de células estromais ovarianas foram avaliados, assim como o seu uso em um modelo *in vivo* de lesão ovariana aguda. Inicialmente, as VEs foram isoladas utilizando as técnicas de UC e UF, e o rendimento e o tamanho das partículas obtidas foram avaliados. No entanto, não foram encontradas diferenças significativas entre as duas metodologias em relação aos ensaios de migração e proliferação das células estromais ovarianas.

Considerando que ambas as metodologias foram capazes de induzir a migração celular, o rendimento obtido por meio da UF mostrou-se um fator determinante para o uso em grande escala *in vivo*. No estudo de lesão ovariana aguda realizado em vacas submetidas a múltiplas aspirações foliculares, três esquemas terapêuticos foram avaliados nos grupos experimentais. O grupo que recebeu a maior quantidade de vesículas apresentou menor recuperação de oócitos e menor produção de embriões, enquanto o grupo que recebeu três doses com a menor quantidade de vesículas mostrou manter a recuperação de oócitos e aumentar a produção de embriões.

Em resumo, embora não tenhamos encontrado diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais, os resultados obtidos até o momento indicam um potencial promissor e fornecem uma base sólida para pesquisas futuras. Essas descobertas preliminares podem contribuir para o desenvolvimento de intervenções ou estratégias mais eficazes, desde que sejam conduzidas investigações adicionais para confirmar e aprofundar nossas observações iniciais, podendo ser aplicada para aumentar produtividade em fêmeas no melhoramento genético de rebanhos, bem como no tratamento de lesões ovarianas, assim como a comercialização das CTM-VEs como um produto terapêutico.

12. REFERÊNCIAS

ABD-ALLAH, Somia H. et al. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. **Cytotherapy**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 64–75, 2013. DOI: 10.1016/j.jcyt.2012.08.001.

AFLATOONIAN, Abbas; OSKOUIAN, Homa; AHMADI, Shahnaz; OSKOUIAN, Leila. RETRACTED ARTICLE: Can fresh embryo transfers be replaced by cryopreserved-thawed embryo transfers in assisted reproductive cycles? A randomized controlled trial. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [S. l.], v. 27, n. 7, p. 357–363, 2010. DOI: 10.1007/s10815-010-9412-9.

ALLELEIN, Susann; MEDINA-PEREZ, Paula; LOPES, Ana Leonor Heitor; RAU, Sabrina; HAUSE, Gerd; KÖLSCH, Andreas; KUHLMEIER, Dirk. Potential and challenges of specifically isolating extracellular vesicles from heterogeneous populations. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 11585, 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-91129-y.

ANSERE, Victor A. et al. Cellular hallmarks of aging emerge in the ovary prior to primordial follicle depletion. **Mechanisms of ageing and development**, [S. l.], v. 194, p. 111425, 2021. DOI: 10.1016/j.mad.2020.111425.

ARISAKA, Yoshinori; YUI, Nobuhiko. Engineering molecularly mobile polyrotaxane surfaces with heparin-binding EGF-like growth factors for improving hepatocyte functions. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, [S. l.], v. 107, n. 5, p. 1080–1085, 2019. DOI: 10.1002/jbm.a.36646.

AUGELLO, A.; KURTH, TB; DE BARI, C. Mesenchymal stem cells: a perspective from *in vitro* cultures to *in vivo* migration and niches. **European Cells and Materials**, [S. l.], v. 20, p. 121–133, 2010. DOI: 10.22203/eCM.v020a11.

AUST, L.; DEVLIN, B.; FOSTER, S. J.; HALVORSEN, Y. D. C.; HICOK, K.; DU LANEY, T.; SEN, A.; WILLINGMYRE, G. D.; GIMBLE, J. M. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates. **Cytotherapy**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 7–14, 2004. DOI: 10.1080/14653240310004539.

BABST, Markus; KATZMANN, David J.; ESTEPA-SABAL, Eden J.; MEERLOO, Timo; EMR, Scott D. Esct-III. **Developmental Cell**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 271–282, 2002. DOI: 10.1016/S1534-5807(02)00220-4.

BAER, Mark; DILLNER, Allan; SCHWARTZ, Richard C.; SEDON, Constance; NEDOSPASOV, Sergei; JOHNSON, Peter F. Tumor Necrosis Factor Alpha Transcription in Macrophages Is Attenuated by an Autocrine Factor That Preferentially Induces NF- κ B p50. **Molecular and Cellular Biology**, [S. l.], v. 18, n. 10, p. 5678–5689, 1998. DOI: 10.1128/MCB.18.10.5678.

BAERWALD, Angela R.; ADAMS, Gregg P.; PIERSON, Roger A. A new model for ovarian follicular development during the human menstrual cycle. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 80, n. 1, p. 116–122, 2003. DOI: 10.1016/S0015-0282(03)00544-2.

BALL, Lynne M. et al. Multiple infusions of mesenchymal stromal cells induce sustained remission in children with steroid-refractory, grade III-IV acute graft-versus-host disease. **British Journal of Haematology**, [S. l.], v. 163, n. 4, p. 501–509, 2013. DOI: 10.1111/bjh.12545.

BENEDIKTER, Birke J. et al. Ultrafiltration combined with size exclusion chromatography efficiently isolates extracellular vesicles from cell culture media for compositional and functional studies. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 15297, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-15717-7.

BENTZINGER, C. Florian; WANG, Yu Xin; VON MALTZAHN, Julia; RUDNICKI, Michael A. The emerging biology of muscle stem cells: implications for cell-based therapies.

BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology, [*S. l.*], v. 35, n. 3, p. 231–41, 2013. DOI: 10.1002/bies.201200063.

BERNARDO, Maria Ester; FIBBE, Willem E. Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. **Cell Stem Cell**, [*S. l.*], v. 13, n. 4, p. 392–402, 2013. DOI: 10.1016/j.stem.2013.09.006.

BEVERS, Edouard M.; COMFURIUS, Paul; DEKKERS, David W. ...; ZWAAL, Robert F. ... Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [*S. l.*], v. 1439, n. 3, p. 317–330, 1999. DOI: 10.1016/S1388-1981(99)00110-9.

BIERNACKA, Anna; FRANGOIANNIS, Nikolaos G. Aging and Cardiac Fibrosis. **Aging and disease**, [*S. l.*], v. 2, n. 2, p. 158–173, 2011.

BLOCKI, Anna; WANG, Yingting; KOCH, Maria; PEH, Priscilla; BEYER, Sebastian; LAW, Ping; HUI, James; RAGHUNATH, Michael. Not All MSCs Can Act as Pericytes: Functional In Vitro Assays to Distinguish Pericytes from Other Mesenchymal Stem Cells in Angiogenesis. **Stem Cells and Development**, [*S. l.*], v. 22, n. 17, p. 2347–2355, 2013. DOI: 10.1089/scd.2012.0415.

BRILEY, Shawn M.; JASTI, Susmita; MCCRACKEN, Jennifer M.; HORNICK, Jessica E.; FEGLEY, Barbara; PRITCHARD, Michele T.; DUNCAN, Francesca E. Reproductive age-associated fibrosis in the stroma of the mammalian ovary. **Reproduction**, [*S. l.*], p. 245–260, 2016. DOI: 10.1530/REP-16-0129.

BROOKER, Amanda S.; BERKOWITZ, Karen M. The Roles of Cohesins in Mitosis, Meiosis, and Human Health and Disease. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 229–266. DOI: 10.1007/978-1-4939-0888-2_11.

BRUDER, S. P.; JAISWAL, N.; HAYNESWORTH, S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. **Journal of cellular biochemistry**, [*S. l.*], v. 64, n. 2, p. 278–94, 1997. DOI: 10.1002/(sici)1097-4644(199702)64:2<278::aid-jcb11>3.0.co;2-f.

BUZHOR, Ella; LESHANSKY, Lucy; BLUMENTHAL, Jacob; BARASH, Hila; WARSHAWSKY, David; MAZOR, Yaron; SHTRICHMAN, Ronit. Cell-based therapy

approaches: the hope for incurable diseases. **Regenerative Medicine**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 649–672, 2014. DOI: 10.2217/rme.14.35.

CANDELARIA, Nicholes R. et al. VCAM1 Is Induced in Ovarian Theca and Stromal Cells in a Mouse Model of Androgen Excess. **Endocrinology**, [S. l.], v. 160, n. 6, p. 1377–1393, 2019. DOI: 10.1210/en.2018-00731.

CAPLAN, Arnold I.; DENNIS, James E. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. **Journal of Cellular Biochemistry**, [S. l.], v. 98, n. 5, p. 1076–1084, 2006. DOI: 10.1002/jcb.20886.

CARVALHO, Juliana L. Characterization of Decellularized Heart Matrices as Biomaterials for Regular and Whole Organ Tissue Engineering and Initial In-vitro Recellularization with Ips Cells. **Journal of Tissue Science & Engineering**, [S. l.], v. S11, 2012. DOI: 10.4172/2157-7552.S11-002.

CHANDRA, Anjani; STEPHEN, Elizabeth Hervey. Infertility service use among U.S. women: 1995 and 2002. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 93, n. 3, p. 725–736, 2010. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2008.10.049.

CHANG, F.; LEE, J. T.; NAVOLANIC, P. M.; STEELMAN, L. S.; SHELTON, J. G.; BLALOCK, W. L.; FRANKLIN, R. A.; MCCUBREY, J. A. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 590–603, 2003. DOI: 10.1038/sj.leu.2402824.

CHEN, Zihao; ZHANG, Ning; CHU, Hang Yin; YU, Yuanyuan; ZHANG, Zong-Kang; ZHANG, Ge; ZHANG, Bao-Ting. Connective Tissue Growth Factor: From Molecular Understandings to Drug Discovery. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 8, 2020. DOI: 10.3389/fcell.2020.593269.

CHIANG, Teresa; SCHULTZ, Richard M.; LAMPSON, Michael A. Age-Dependent Susceptibility of Chromosome Cohesion to Premature Separase Activation in Mouse Oocytes1. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 85, n. 6, p. 1279–1283, 2011. DOI: 10.1095/biolreprod.111.094094.

CHIANG, Teresa; SCHULTZ, Richard M.; LAMPSON, Michael A. Meiotic Origins of Maternal Age-Related Aneuploidy1. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 86, n. 1, 2012. DOI: 10.1095/biolreprod.111.094367.

CHOE, Jooae; LEE, Sang Min; LIM, Soyeoun; CHOI, Se Hoon; KIM, Namkug; DO, Kyung-Hyun; SEO, Joon Beom. Doubling time of thymic epithelial tumours on CT: correlation with histological subtype. **European Radiology**, [S. l.], v. 27, n. 10, p. 4030–4036, 2017. DOI: 10.1007/s00330-017-4795-y.

CHOUDHERY, Mahmood S.; BADOWSKI, Michael; MUISE, Angela; PIERCE, John; HARRIS, David T. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. **Journal of Translational Medicine**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 8, 2014. DOI: 10.1186/1479-5876-12-8.

CICCOCIOPPO, Rachele; GALLIA, Alessandra; SGARELLA, Adele; KRUZLIAK, Peter; GOBBI, Paolo G.; CORAZZA, Gino Roberto. Long-Term Follow-Up of Crohn Disease Fistulas After Local Injections of Bone Marrow–Derived Mesenchymal Stem Cells. **Mayo Clinic Proceedings**, [S. l.], v. 90, n. 6, p. 747–755, 2015. DOI: 10.1016/j.mayocp.2015.03.023.

COLOMBO, Marina; RAPOSO, Graça; THÉRY, Clotilde. Biogenesis, Secretion, and Intercellular Interactions of Exosomes and Other Extracellular Vesicles. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 255–289, 2014. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev-cellbio-101512-122326>.

CONDE-VANCELLS, Javier et al. Characterization and Comprehensive Proteome Profiling of Exosomes Secreted by Hepatocytes. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. 5157–5166, 2008. DOI: 10.1021/pr8004887.

CORRAO, Simona; LA ROCCA, Giampiero; LO IACONO, Melania; CORSELLO, Tiziana; FARINA, Felicia; ANZALONE, Rita. Umbilical cord revisited: from Wharton’s jelly myofibroblasts to mesenchymal stem cells. **Histology and histopathology**, [S. l.], v. 28, n. 10, p. 1235–44, 2013. DOI: 10.14670/HH-28.1235.

CORRÊA, Marilena C. D. V; LOYOLA, Maria Andrea. Tecnologias de reprodução assistida no Brasil: opções para ampliar o acesso. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 753–777, 2015. DOI: 10.1590/S0103-73312015000300005.

CORSELLI, Mirko et al. Perivascular support of human hematopoietic stem/progenitor cells. **Blood**, [S. l.], v. 121, n. 15, p. 2891–901, 2013. DOI: 10.1182/blood-2012-08-451864.

COWAN, Chad A.; ATIENZA, Jocelyn; MELTON, Douglas A.; EGGAN, Kevin. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 309, n. 5739, p. 1369–73, 2005. DOI: 10.1126/science.1116447.

DE ÁVILA, Ana Clara Faquinesi Cavalcante Mendes; ANDRADE, Gabriella Mamede; BRIDI, Alessandra; GIMENES, Lindsay Unno; MEIRELLES, Flávio Vieira; PERECIN, Felipe; DA SILVEIRA, Juliano Coelho. Extracellular vesicles and its advances in female reproduction. **Animal reproduction**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 31–38, 2020. DOI: 10.21451/1984-3143-AR2018-00101.

DE FRANCESCO, Francesco; RICCI, Giulia; D’ANDREA, Francesco; NICOLETTI, Giovanni Francesco; FERRARO, Giuseppe Andrea. Human Adipose Stem Cells: From Bench to Bedside. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [S. l.], v. 21, n. 6, p. 572–584, 2015. DOI: 10.1089/ten.teb.2014.0608.

DE LIZARRONDO, Sara Martínez et al. Synergistic Effect of Thrombin and CD40 Ligand on Endothelial Matrix Metalloproteinase-10 Expression and Microparticle Generation *In Vitro* and *In Vivo*. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 1477–1487, 2012. DOI: 10.1161/ATVBAHA.112.248773.

DE OLIVEIRA BRAVO, Martha; CARVALHO, Juliana Lott; SALDANHA-ARAÚJO, Felipe. Adenosine production: a common path for mesenchymal stem-cell and regulatory T-cell-mediated immunosuppression. **Purinergic Signalling**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 595–609, 2016. DOI: 10.1007/s11302-016-9529-0.

DEVEZA, Lorenzo; CHOI, Jeffrey; IMANBAYEV, Galym; YANG, Fan. Paracrine Release from Nonviral Engineered Adipose-Derived Stem Cells Promotes Endothelial Cell Survival and Migration *In Vitro*. **Stem Cells and Development**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 483–491, 2013.

DOI: 10.1089/scd.2012.0201. Disponível em:
<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/scd.2012.0201>.

DOMINICI, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 315–317, 2006. DOI: 10.1080/14653240600855905.

DUNCAN, Henry F.; KOBAYASHI, Yoshifumi; SHIMIZU, Emi. Growth Factors and Cell Homing in Dental Tissue Regeneration. **Current Oral Health Reports**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 276–285, 2018. DOI: 10.1007/s40496-018-0194-y.

EDSON, Mark A.; NAGARAJA, Ankur K.; MATZUK, Martin M. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 30, n. 6, p. 624–712, 2009. DOI: 10.1210/er.2009-0012.

EL ANDALOUSSI, Samir; MÄGER, Imre; BREAKFIELD, Xandra O.; WOOD, Matthew J. A. Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. **Nature Reviews Drug Discovery**, [S. l.], v. 12, n. 5, p. 347–357, 2013. DOI: 10.1038/nrd3978.

ERICES, A.; CONGET, P.; MINGUELL, J. J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. **British journal of haematology**, [S. l.], v. 109, n. 1, p. 235–42, 2000. DOI: 10.1046/j.1365-2141.2000.01986.x.

FALANGA, Vincent. Stem Cells in Tissue Repair and Regeneration. **Journal of Investigative Dermatology**, [S. l.], v. 132, n. 6, p. 1538–1541, 2012. DOI: 10.1038/jid.2012.77.

FALATI, Shahrokh et al. Accumulation of Tissue Factor into Developing Thrombi *In Vivo* Is Dependent upon Microparticle P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 and Platelet P-Selectin. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 197, n. 11, p. 1585–1598, 2003. DOI: 10.1084/jem.20021868.

FAN, Jiabing; VARSHNEY, Rohan R.; REN, Li; CAI, Daozhang; WANG, Dong-An. Synovium-Derived Mesenchymal Stem Cells: A New Cell Source for Musculoskeletal Regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 75–86, 2009. DOI: 10.1089/ten.teb.2008.0586.

FERNÁNDEZ-LÁZARO, Diego; DÍAZ, Joseba; CABALLERO, Alberto; CÓRDOVA, Alfredo. The training of strength-resistance in hypoxia: effect on muscle hypertrophy. **Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 212–220, 2019. DOI: 10.7705/biomedica.v39i1.4084.

FRIEDENSTEIN, A. J.; CHAILAKHJAN, R. K.; LALYKINA, K. S. THE DEVELOPMENT OF FIBROBLAST COLONIES IN MONOLAYER CULTURES OF GUINEA-PIG BONE MARROW AND SPLEEN CELLS. **Cell Proliferation**, [S. l.], v. 3, n. 4, p. 393–403, 1970. DOI: 10.1111/j.1365-2184.1970.tb00347.x.

GALLAHER, Jill A.; BROWN, Joel S.; ANDERSON, Alexander R. A. The impact of proliferation-migration tradeoffs on phenotypic evolution in cancer. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 2425, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-39636-x.

GARDINER, Chris; VIZIO, Dolores Di; SAHOO, Susmita; THÉRY, Clotilde; WITWER, Kenneth W.; WAUBEN, Marca; HILL, Andrew F. Techniques used for the isolation and characterization of extracellular vesicles: results of a worldwide survey. **Journal of Extracellular Vesicles**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 32945, 2016. DOI: 10.3402/jev.v5.32945.

GAY, IC; CHEN, S.; MACDOUGALL, M. Isolation and characterization of multipotent human periodontal ligament stem cells. **Orthodontics & Craniofacial Research**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 149–160, 2007. DOI: 10.1111/j.1601-6343.2007.00399.x.

GÉMINARD, Charles; DE GASSART, Aude; BLANC, Lionel; VIDAL, Michel. Degradation of AP2 During Reticulocyte Maturation Enhances Binding of Hsc70 and Alix to a Common Site on TfR for Sorting into Exosomes. **Traffic**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 181–193, 2004. DOI: 10.1111/j.1600-0854.2004.0167.x.

GIMÉNEZ, Alícia; DUCH, Paula; PUIG, Marta; GABASA, Marta; XAUBET, Antoni; ALCARAZ, Jordi. Dysregulated Collagen Homeostasis by Matrix Stiffening and TGF- β 1 in Fibroblasts from Idiopathic Pulmonary Fibrosis Patients: Role of FAK/Akt. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 11, p. 2431, 2017. DOI: 10.3390/ijms18112431.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Animal Reproduction Science**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 187–200, 1989. DOI: 10.1016/0378-4320(89)90084-5.

GRIFFITHS, Mark JD; BONNET, Dominique; JANES, Sam M. Stem cells of the alveolar epithelium. **The Lancet**, [S. l.], v. 366, n. 9481, p. 249–260, 2005. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66916-4.

GROCHOWSKI, Cezary; RADZIKOWSKA, Elżbieta; MACIEJEWSKI, Ryszard. Neural stem cell therapy—Brief review. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, [S. l.], v. 173, p. 8–14, 2018. DOI: 10.1016/j.clineuro.2018.07.013.

GUPTA, Dhanu; ZICKLER, Antje Maria; EL ANDALOUSSI, Samir. Dosing extracellular vesicles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S. l.], v. 178, p. 113961, 2021. DOI: 10.1016/j.addr.2021.113961. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169409X21003549>.

GYÖRGY, Bence et al. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 68, n. 16, p. 2667–2688, 2011. DOI: 10.1007/s00018-011-0689-3.

HAN, Jinah et al. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 Controls Neural Stem Cell Activation in Mice and Humans. **Cell Reports**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 1158–1172, 2015. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.01.049.

HAYNESWORTH, Stephen E.; BABER, Marilyn A.; CAPLAN, Arnold I. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells *in vitro*: Effects of dexamethasone and IL-1 α . **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 166, n. 3, p. 585–592, 1996. DOI: 10.1002/(SICI)1097-4652(199603)166:3<585::AID-JCP13>3.0.CO;2-6.

HEIJNEN, H. F.; SCHIEL, A. E.; FIJNHEER, R.; GEUZE, H. J.; SIXMA, J. J. Activated platelets release two types of membrane vesicles: microvesicles by surface shedding and exosomes derived from exocytosis of multivesicular bodies and alpha-granules. **Blood**, [S. l.], v. 94, n. 11, p. 3791–9, 1999.

HELLBERG, Carina; ÖSTMAN, Arne; HELDIN, C. H. PDGF and Vessel Maturation. *In*: [s.l.: s.n.], p. 103–114. DOI: 10.1007/978-3-540-78281-0_7.

HOLTON, Rebecca A.; HARRIS, Abigail M.; MUKERJI, Barenya; SINGH, Tanu; DIA, Ferdusy; BERKOWITZ, Karen M. CHTF18 ensures the quantity and quality of the ovarian reserve†. **Biology of Reproduction**, [*S. l.*], v. 103, n. 1, p. 24–35, 2020. DOI: 10.1093/biolre/ioaa036.

HONG, Hyun Sook; KIM, Yeong Hoon; SON, Youngsook. Perspectives on mesenchymal stem cells: tissue repair, immune modulation, and tumor homing. **Archives of pharmacal research**, [*S. l.*], v. 35, n. 2, p. 201–11, 2012. DOI: 10.1007/s12272-012-0201-0.

HOOGDUIJN, Martin J.; LOMBARDO, Eleuterio. Mesenchymal Stromal Cells Anno 2019: Dawn of the Therapeutic Era? Concise Review. **Stem Cells Translational Medicine**, [*S. l.*], v. 8, n. 11, p. 1126–1134, 2019. DOI: 10.1002/sctm.19-0073.

HORNICK, J. E.; DUNCAN, F. E.; SHEA, L. D.; WOODRUFF, T. K. Isolated primate primordial follicles require a rigid physical environment to survive and grow in vitro. **Human Reproduction**, [*S. l.*], v. 27, n. 6, p. 1801–1810, 2012. DOI: 10.1093/humrep/der468.

HUANG, Boxian; LU, Jiafeng; DING, Chenyue; ZOU, Qinyan; WANG, Wei; LI, Hong. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of premature ovarian insufficiency by targeting SMAD. **Stem Cell Research & Therapy**, [*S. l.*], v. 9, n. 1, p. 216, 2018. DOI: 10.1186/s13287-018-0953-7.

HUGEL, Bénédicte; MARTÍNEZ, M. Carmen; KUNZELMANN, Corinne; FREYSSINET, Jean-Marie. Membrane microparticles: two sides of the coin. **Physiology (Bethesda, Md.)**, [*S. l.*], v. 20, p. 22–7, 2005. DOI: 10.1152/physiol.00029.2004.

HUNT, Patricia A.; HASSOLD, Terry J. Human female meiosis: what makes a good egg go bad? **Trends in Genetics**, [*S. l.*], v. 24, n. 2, p. 86–93, 2008. DOI: 10.1016/j.tig.2007.11.010.

HURLEY, James H.; HANSON, Phyllis I. Membrane budding and scission by the ESCRT machinery: it's all in the neck. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [*S. l.*], v. 11, n. 8, p. 556–566, 2010. DOI: 10.1038/nrm2937.

IISMAA, Siiri E.; KAIDONIS, Xenia; NICKS, Amy M.; BOGUSH, Nikolay; KIKUCHI, Kazu; NAQVI, Nawazish; HARVEY, Richard P.; HUSAIN, Ahsan; GRAHAM, Robert M. Comparative regenerative mechanisms across different mammalian tissues. **npj Regenerative Medicine**, [*S. l.*], v. 3, n. 1, p. 6, 2018. DOI: 10.1038/s41536-018-0044-5.

ITO, Masayuki; HARADA, Tasuku; TANIKAWA, Masahiro; FUJII, Akiko; SHIOTA, Goshi; TERAOKAWA, Naoki. Hepatocyte growth factor and stem cell factor involvement in paracrine interplays of theca and granulosa cells in the human ovary. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 75, n. 5, p. 973–979, 2001. DOI: 10.1016/S0015-0282(01)01747-2.

J. BRAGA OSORIO GOMES SALGADO, Antonio; L. GONCALVES REIS, Rui; JORGE CARVALHO SOUSA, Nuno; M. GIMBLE, Jeffrey; J. SALGADO, Antonio; L. REIS, Rui; SOUSA, Nuno. Adipose Tissue Derived Stem Cells Secretome: Soluble Factors and Their Roles in Regenerative Medicine. **Current Stem Cell Research & Therapy**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 103–110, 2010. DOI: 10.2174/157488810791268564.

JACKSON, Wesley M.; NESTI, Leon J.; TUAN, Rocky S. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. **Expert Opinion on Biological Therapy**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 505–517, 2010. DOI: 10.1517/14712591003610606.

JANSEN, Flip H. et al. Exosomal Secretion of Cytoplasmic Prostate Cancer Xenograft-derived Proteins. **Molecular & Cellular Proteomics**, [S. l.], v. 8, n. 6, p. 1192–1205, 2009. DOI: 10.1074/mcp.M800443-MCP200.

JOHNSON, Martin. Human *in vitro* fertilisation and developmental biology: a mutually influential history. **Development**, [S. l.], v. 146, n. 17, 2019. DOI: 10.1242/dev.183145.

JORGE, Soledad; CHANG, Sydney; BARZILAI, Joshua J.; LEPPERT, Phyllis; SEGARS, James H. Mechanical Signaling in Reproductive Tissues: Mechanisms and Importance. **Reproductive Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 9, p. 1093–1107, 2014. DOI: 10.1177/1933719114542023.

KENIGSBURG, Shlomit; WYSE, Brandon A.; LIBRACH, Clifford L.; DA SILVEIRA, Juliano C. Protocol for Exosome Isolation from Small Volume of Ovarian Follicular Fluid: Evaluation of Ultracentrifugation and Commercial Kits. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 321–341. DOI: 10.1007/978-1-4939-7253-1_26.

KINNEAR, Hadrian M.; TOMASZEWSKI, Claire E.; CHANG, Faith L.; MORAVEK, Molly B.; XU, Min; PADMANABHAN, Vasantha; SHIKANOV, Ariella. The ovarian stroma as a new frontier. **Reproduction**, [S. l.], v. 160, n. 3, p. R25–R39, 2020. DOI: 10.1530/REP-19-0501.

KOSAKA, Naomichi; SUDO, Natsuko; MIYAMOTO, Akio; SHIMIZU, Takashi. Vascular endothelial growth factor (VEGF) suppresses ovarian granulosa cell apoptosis *in vitro*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 363, n. 3, p. 733–737, 2007. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.09.061.

KOSAKA, Nobuyoshi; IGUCHI, Haruhisa; YOSHIOKA, Yusuke; TAKESHITA, Fumitaka; MATSUKI, Yasushi; OCHIYA, Takahiro. Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 285, n. 23, p. 17442–17452, 2010. DOI: 10.1074/jbc.M110.107821.

KULEBYAKIN, Konstantin Yu.; NIMIRITSKY, Peter P.; MAKAREVICH, Pavel I. Growth Factors in Regeneration and Regenerative Medicine: “the Cure and the Cause”. **Frontiers in Endocrinology**, [S. l.], v. 11, 2020. DOI: 10.3389/fendo.2020.00384.

KUNZE, Albrecht et al. Connexin expression by radial glia-like cells is required for neurogenesis in the adult dentate gyrus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 106, n. 27, p. 11336–11341, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0813160106.

LACAR, Benjamin; HERMAN, Peter; PLATEL, Jean-Claude; KUBERA, Cathryn; HYDER, Fahmeed; BORDEY, Angelique. Neural Progenitor Cells Regulate Capillary Blood Flow in the Postnatal Subventricular Zone. **The Journal of Neuroscience**, [S. l.], v. 32, n. 46, p. 16435–16448, 2012. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1457-12.2012.

LAJTHA, L. G. Stem cells and their properties. **Proceedings. Canadian Cancer Conference**, [S. l.], v. 7, p. 31–9, 1967.

LAKKARAJU, Aparna; RODRIGUEZ-BOULAN, Enrique. Itinerant exosomes: emerging roles in cell and tissue polarity. **Trends in Cell Biology**, [S. l.], v. 18, n. 5, p. 199–209, 2008. DOI: 10.1016/j.tcb.2008.03.002.

LARIJANI, Bagher et al. Stem cell therapy in treatment of different diseases. **Acta medica Iranica**, [S. l.], v. 50, n. 2, p. 79–96, 2012.

LAUAND, Camila. **Avaliação da proliferação e migração celular mediadas pela ativação do EGFR em linhagens celulares de câncer de pulmão cultivadas como monocamadas e esferoides**. 2016. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016. DOI: 10.11606/T.42.2016.tde-25022016-095442.

LAULAGNIER, Karine et al. Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. **Biochemical Journal**, [S. l.], v. 380, n. 1, p. 161–171, 2004. DOI: 10.1042/bj20031594.

LEE, Evelyn; CHAMBERS, Georgina Mary; HALE, Lyndon; ILLINGWORTH, Peter; WILTON, Leeanda. Assisted reproductive technology (ART) cumulative live birth rates following preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy (PGD-A) or morphological assessment of embryos: A cohort analysis. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology**, [S. l.], v. 58, n. 5, p. 525–532, 2018. DOI: 10.1111/ajo.12756.

LEVENTIS, Peter A.; GRINSTEIN, Sergio. The Distribution and Function of Phosphatidylserine in Cellular Membranes. **Annual Review of Biophysics**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 407–427, 2010. DOI: 10.1146/annurev.biophys.093008.131234.

LI, Yu-Lin; HAO, Wen-Jing; CHEN, Bo-Ya; CHEN, Jing; LI, Guo-Qi. Cardiac Fibroblast-Specific Activating Transcription Factor 3 Promotes Myocardial Repair after Myocardial Infarction. **Chinese medical journal**, [S. l.], v. 131, n. 19, p. 2302–2309, 2018. DOI: 10.4103/0366-6999.241794.

LIANG, Chun-Chi; PARK, Ann Y.; GUAN, Jun-Lin. *In vitro* scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration *in vitro*. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007. DOI: 10.1038/nprot.2007.30.

LIM, J.; LUDERER, U. Oxidative Damage Increases and Antioxidant Gene Expression Decreases with Aging in the Mouse Ovary. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 84, n. 4, p. 775–782, 2011. DOI: 10.1095/biolreprod.110.088583.

LIN, Jin; LI, Jing; HUANG, Bo; LIU, Jing; CHEN, Xin; CHEN, Xi-Min; XU, Yan-Mei; HUANG, Lin-Feng; WANG, Xiao-Zhong. Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. **The Scientific World Journal**, [S. l.], v. 2015, p. 1–8, 2015. DOI: 10.1155/2015/657086.

LIN, Wayne; TITUS, Shiny; MOY, Fred; GINSBURG, Elizabeth S.; OKTAY, Kutluk. Ovarian Aging in Women With BRCA Germline Mutations. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 102, n. 10, p. 3839–3847, 2017. DOI: 10.1210/jc.2017-00765.

LINARES, Romain; TAN, Sisareuth; GOUNOU, Céline; ARRAUD, Nicolas; BRISSON, Alain R. High-speed centrifugation induces aggregation of extracellular vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 29509, 2015. DOI: 10.3402/jev.v4.29509.

LIU, Menghe; HUMMITZSCH, Katja; BASTIAN, Nicole A.; HARTANTI, Monica D.; WAN, Qianhui; IRVING-RODGERS, Helen F.; ANDERSON, Richard A.; RODGERS, Raymond J. Isolation, culture, and characterisation of bovine ovarian fetal fibroblasts and gonadal ridge epithelial-like cells and comparison to their adult counterparts. **PloS one**, [S. l.], v. 17, n. 7, p. e0268467, 2022. DOI: 10.1371/journal.pone.0268467.

LÖTVALL, Jan et al. Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. **Journal of Extracellular Vesicles**, [S. l.], v. 3, n. 1, p. 26913, 2014. DOI: 10.3402/jev.v3.26913.

MAHESHWARI, Abha et al. Study protocol: E-freeze - freezing of embryos in assisted conception: a randomised controlled trial evaluating the clinical and cost effectiveness of a policy of freezing embryos followed by thawed frozen embryo transfer compared with a policy of fresh embryo transfer, in women undergoing *in vitro* fertilisation. **Reproductive Health**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 81, 2019. DOI: 10.1186/s12978-019-0737-2.

MAHESHWARI, Abha; PANDEY, Shilpi; AMALRAJ RAJA, Edwin; SHETTY, Ashalatha; HAMILTON, Mark; BHATTACHARYA, Siladitya. Is frozen embryo transfer better for mothers and babies? Can cumulative meta-analysis provide a definitive answer? **Human Reproduction Update**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 35–58, 2018. DOI: 10.1093/humupd/dmx031.

MAKRIDAKIS, Manousos; ROUBELAKIS, Maria G.; VLAHOU, Antonia. Stem cells: Insights into the secretome. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, [S. l.], v. 1834, n. 11, p. 2380–2384, 2013. DOI: 10.1016/j.bbapap.2013.01.032.

MALARD, Patricia F. et al. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and *in vitro* embryo production in a bovine model of fertility loss. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 8018, 2020. DOI: 10.1038/s41598-020-64810-x.

MALHI, Pritpal S.; ADAMS, Gregg P.; SINGH, Jaswant. Bovine Model for the Study of Reproductive Aging in Women: Follicular, Luteal, and Endocrine Characteristics1. **Biology of Reproduction**, [S. l.], v. 73, n. 1, p. 45–53, 2005. DOI: 10.1095/biolreprod.104.038745.

MANNERING, Stuart I.; MORRIS, Jessica S.; JENSEN, Kent P.; PURCELL, Anthony W.; HONEYMAN, Margo C.; VAN ENDERT, Peter M.; HARRISON, Leonard C. A sensitive method for detecting proliferation of rare autoantigen-specific human T cells. **Journal of Immunological Methods**, [S. l.], v. 283, n. 1–2, p. 173–183, 2003. DOI: 10.1016/j.jim.2003.09.004. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022175903003661>.

MANSHADI, Marjan D.; NAVID, Shadan; HOSHINO, Yumi; DANESHI, Erfan; NOORY, Parastoo; ABBASI, Mehdi. 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 and Technique**, [S. l.], v. 82, n. 6, p. 635–642, 2019. DOI: 10.1002/jemt.23120. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jemt.23120>.

MARFY-SMITH, Stephanie J.; CLARKIN, Claire E. Are Mesenchymal Stem Cells So Bloody Great After All? **Stem cells translational medicine**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 3–6, 2017. DOI: 10.5966/sctm.2016-0026.

MARX, Camila; SILVEIRA, Maiele Dornelles; BEYER NARDI, Nance. Adipose-Derived Stem Cells in Veterinary Medicine: Characterization and Therapeutic Applications. **Stem Cells and Development**, [S. l.], v. 24, n. 7, p. 803–813, 2015. DOI: 10.1089/scd.2014.0407.

MAZINI, Loubna; ROCHETTE, Luc; ADMOU, Brahim; AMAL, Said; MALKA, Gabriel. Hopes and Limits of Adipose-Derived Stem Cells (ADSCs) and Mesenchymal Stem Cells (MSCs) in Wound Healing. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 21, n. 4, p. 1306, 2020. DOI: 10.3390/ijms21041306.

MCCONNELL, Russell E.; HIGGINBOTHAM, James N.; SHIFRIN, David A.; TABB, David L.; COFFEY, Robert J.; TYSKA, Matthew J. The enterocyte microvillus is a vesicle-generating organelle. **The Journal of cell biology**, [S. l.], v. 185, n. 7, p. 1285–98, 2009. DOI: 10.1083/jcb.200902147.

MCGEE, Elizabeth A.; HSUEH, Aaron J. W. Initial and Cyclic Recruitment of Ovarian Follicles*. **Endocrine Reviews**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 200–214, 2000. DOI: 10.1210/edrv.21.2.0394.

MEZOUAR, Soraya; DARBOUSSET, Roxane; DIGNAT-GEORGE, Françoise; PANICOT-DUBOIS, Laurence; DUBOIS, Christophe. Inhibition of platelet activation prevents the P-selectin and integrin-dependent accumulation of cancer cell microparticles and reduces tumor growth and metastasis *in vivo*. **International Journal of Cancer**, [S. l.], v. 136, n. 2, p. 462–475, 2015. DOI: 10.1002/ijc.28997.

MIAO, Z.; JIN, J.; CHEN, L.; ZHU, J.; HUANG, W.; ZHAO, J.; QIAN, H.; ZHANG, X. Isolation of mesenchymal stem cells from human placenta: Comparison with human bone marrow mesenchymal stem cells. **Cell Biology International**, [S. l.], v. 30, n. 9, p. 681–687, 2006. DOI: 10.1016/j.cellbi.2006.03.009.

MORELLO, Matteo et al. Large oncosomes mediate intercellular transfer of functional microRNA. **Cell Cycle**, [S. l.], v. 12, n. 22, p. 3526–3536, 2013. DOI: 10.4161/cc.26539.

MURALIDHARAN-CHARI, Vandhana; CLANCY, James W.; SEDGWICK, Alanna; D'SOUZA-SCHOREY, Crislyn. Microvesicles: mediators of extracellular communication during cancer progression. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 123, n. 10, p. 1603–1611, 2010. DOI: 10.1242/jcs.064386.

NEARY, Roisin; WATSON, Chris J.; BAUGH, John A. Epigenetics and the overhealing wound: the role of DNA methylation in fibrosis. **Fibrogenesis & Tissue Repair**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 18, 2015. DOI: 10.1186/s13069-015-0035-8.

NEILSON, DUNCAN; JONES, GEORGEANNA SEEGAR; WOODRUFF, J. DONALD; GOLDBERG, BENJAMIN. THE INNERVATION OF THE OVARY. **Obstetrical & Gynecological Survey**, [S. l.], v. 25, n. 10, p. 889–904, 1970. DOI: 10.1097/00006254-197010000-00001.

NICE guidelines. Fertility., 2015. [S. l.], [s.d.].

OLVER, Christine; VIDAL, Michel. Proteomic Analysis of Secreted Exosomes. *In: Subcellular Proteomics*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2007. p. 99–131. DOI: 10.1007/978-1-4020-5943-8_7.

OUNI, E.; BOUZIN, C.; DOLMANS, M. M.; MARBAIX, E.; PYR DIT RUYS, S.; VERTOMMEN, D.; AMORIM, C. A. Spatiotemporal changes in mechanical matrix components of the human ovary from prepuberty to menopause. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 35, n. 6, p. 1391–1410, 2020. DOI: 10.1093/humrep/deaa100.

PARK, Selena U.; WALSH, Leann; BERKOWITZ, Karen M. Mechanisms of ovarian aging. **Reproduction**, [S. l.], v. 162, n. 2, p. R19–R33, 2021. DOI: 10.1530/REP-21-0022.

PASTAR, Irena et al. Epithelialization in Wound Healing: A Comprehensive Review. **Advances in Wound Care**, [S. l.], v. 3, n. 7, p. 445–464, 2014. DOI: 10.1089/wound.2013.0473.

PAVANI, Krishna C.; ALMINANA, Carmen; WYDOOGHE, Eline; CATTEEUW, Maaïke; RAMÍREZ, Miguel A.; MERMILLOD, Pascal; RIZOS, Dimitrios; VAN SOOM, Ann. Emerging role of extracellular vesicles in communication of preimplantation embryos *in vitro*. **Reproduction, Fertility and Development**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 66, 2017. DOI: 10.1071/RD16318.

PENDLETON, Courtney; LI, Qian; CHESLER, David A.; YUAN, Kristy; GUERRERO-CAZARES, Hugo; QUINONES-HINOJOSA, Alfredo. Mesenchymal Stem Cells Derived from Adipose Tissue vs Bone Marrow: *In Vitro* Comparison of Their Tropism towards Gliomas. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. e58198, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0058198.

PIERCE, Sarah B.; GERSAK, Ksenija; MICHAELSON-COHEN, Rachel; WALSH, Tom; LEE, Ming K.; MALACH, Daniel; KLEVIT, Rachel E.; KING, Mary-Claire; LEVY-LAHAD, Ephrat. Mutations in LARS2, Encoding Mitochondrial Leucyl-tRNA Synthetase, Lead to Premature Ovarian Failure and Hearing Loss in Perrault Syndrome. **The American Journal of Human Genetics**, [S. l.], v. 92, n. 4, p. 614–620, 2013. DOI: 10.1016/j.ajhg.2013.03.007.

PIPER M. TREUTING. **Comparative Anatomy and Histology**. [s.l.] : Elsevier, 2018. DOI: 10.1016/C2014-0-03145-0.

PIRES, Ana O. et al. Unveiling the Differences of Secretome of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells, Adipose Tissue-Derived Stem Cells, and Human Umbilical Cord Perivascular Cells: A Proteomic Analysis. **Stem Cells and Development**, [S. l.], v. 25, n. 14, p. 1073–1083, 2016. DOI: 10.1089/scd.2016.0048.

PIZARRO, Bartira Marques et al. Estradiol and Progesterone Levels are Related to Redox Status in the Follicular Fluid During In Vitro Fertilization. **Journal of the Endocrine Society**, [S. l.], v. 4, n. 7, 2020. DOI: 10.1210/jendso/bvaa064.

POLS, Maaïke S.; KLUMPERMAN, Judith. Trafficking and function of the tetraspanin CD63. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 315, n. 9, p. 1584–1592, 2009. DOI: 10.1016/j.yexcr.2008.09.020.

PROCKOP, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 276, n. 5309, p. 71–4, 1997. DOI: 10.1126/science.276.5309.71.

PROCKOP, D. J. “Stemness” Does Not Explain the Repair of Many Tissues by Mesenchymal Stem/Multipotent Stromal Cells (MSCs). **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, [S. l.], v. 82, n. 3, p. 241–243, 2007. DOI: 10.1038/sj.clpt.6100313.

QU, Feini; GUILAK, Farshid; MAUCK, Robert L. Cell migration: implications for repair and regeneration in joint disease. **Nature Reviews Rheumatology**, [S. l.], v. 15, n. 3, p. 167–179, 2019. DOI: 10.1038/s41584-018-0151-0.

REINKE, J. M.; SORG, H. Wound Repair and Regeneration. **European Surgical Research**, [S. l.], v. 49, n. 1, p. 35–43, 2012. DOI: 10.1159/000339613. Disponível em: <https://www.karger.com/Article/FullText/339613>.

ROBERTS, John F.; JEFF HUANG, Chen-Che. Bovine models for human ovarian diseases. *In*: [s.l.: s.n.]. p. 101–154. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2022.02.001.

SACCHETTI, Benedetto et al. Self-Renewing Osteoprogenitors in Bone Marrow Sinusoids Can Organize a Hematopoietic Microenvironment. **Cell**, [S. l.], v. 131, n. 2, p. 324–336, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.025.

SALDANHA-ARAÚJO, Felipe et al. Mesenchymal stem cells promote the sustained expression of CD69 on activated T lymphocytes: roles of canonical and non-canonical NF-κB signalling. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [S. l.], v. 16, n. 6, p. 1232–1244, 2012. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2011.01391.x.

SALDANHA-ARAÚJO, Felipe; FERREIRA, Flávia I. S.; PALMA, Patrícia V.; ARAÚJO, Amélia G.; QUEIROZ, Regina H. C.; COVAS, Dimas T.; ZAGO, Marco A.; PANEPUCCHI,

Rodrigo A. Mesenchymal stromal cells up-regulate CD39 and increase adenosine production to suppress activated T-lymphocytes. **Stem Cell Research**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 66–74, 2011. DOI: 10.1016/j.scr.2011.04.001.

SANTL, B.; WENIGERKIND, H.; SCHERNTHANER, W.; MÖDL, J.; STOJKOVIC, M.; PRELLE, K.; HOLTZ, W.; BREM, G.; WOLF, E. Comparison of ultrasound-guided vs laparoscopic transvaginal ovum pick-up (OPU) in simmental heifers. **Theriogenology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 89–100, 1998. DOI: 10.1016/S0093-691X(98)00116-2.

SCHNEIDER, Enja et al. CD73-mediated adenosine production by CD8 T cell-derived extracellular vesicles constitutes an intrinsic mechanism of immune suppression. **Nature Communications**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 5911, 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-26134-w.

SEREJO, Teresa Raquel Tavares; SILVA-CARVALHO, Amandda Évelin; BRAGA, Luma Dayane de Carvalho Filiú; NEVES, Francisco de Assis Rocha; PEREIRA, Rinaldo Wellerson; CARVALHO, Juliana Lott De; SALDANHA-ARAÚJO, Felipe. Assessment of the Immunosuppressive Potential of INF- γ Licensed Adipose Mesenchymal Stem Cells, Their Secretome and Extracellular Vesicles. *Cells*, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 22, 2019. DOI: 10.3390/cells8010022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/1/22>.

SHABBIR, Arsalan; COX, Audrey; RODRIGUEZ-MENOCAL, Luis; SALGADO, Marcela; BADIAVAS, Evangelos Van. Mesenchymal Stem Cell Exosomes Induce Proliferation and Migration of Normal and Chronic Wound Fibroblasts, and Enhance Angiogenesis *In Vitro*. **Stem Cells and Development**, [S. l.], v. 24, n. 14, p. 1635–1647, 2015. DOI: 10.1089/scd.2014.0316.

SHAH, Jaimin S.; SABOUNI, Reem; CAYTON VAUGHT, Kamaria C.; OWEN, Carter M.; ALBERTINI, David F.; SEGARS, James H. Biomechanics and mechanical signaling in the ovary: a systematic review. **Journal of assisted reproduction and genetics**, [S. l.], v. 35, n. 7, p. 1135–1148, 2018. DOI: 10.1007/s10815-018-1180-y.

SHAPIRO, Bruce S.; DANESHMAND, Said T.; GARNER, Forest C.; AGUIRRE, Martha; HUDSON, Cynthia; THOMAS, Shyni. Evidence of impaired endometrial receptivity after ovarian stimulation for in vitro fertilization: a prospective randomized trial comparing fresh and frozen–thawed embryo transfer in normal responders. **Fertility and Sterility**, [S. l.], v. 96, n. 2, p. 344–348, 2011. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2011.05.050.

SHI, Jihong et al. Anti-Fibrotic Actions of Interleukin-10 against Hypertrophic Scarring by Activation of PI3K/AKT and STAT3 Signaling Pathways in Scar-Forming Fibroblasts. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. e98228, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0098228.

SIMPSON, Richard J.; JENSEN, Søren S.; LIM, Justin W. E. Proteomic profiling of exosomes: Current perspectives. **PROTEOMICS**, [S. l.], v. 8, n. 19, p. 4083–4099, 2008. DOI: 10.1002/pmic.200800109.

SMILER, Dennis; SOLTAN, Muna; ALBITAR, Maher. Toward the Identification of Mesenchymal Stem Cells in Bone Marrow and Peripheral Blood for Bone Regeneration. **Implant Dentistry**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 236–247, 2008. DOI: 10.1097/ID.0b013e3181835b13.

SUBRA, Caroline et al. Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. **Journal of Lipid Research**, [S. l.], v. 51, n. 8, p. 2105–2120, 2010. DOI: 10.1194/jlr.M003657.

SUBRA, Caroline; LAULAGNIER, Karine; PERRET, Bertrand; RECORD, Michel. Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. **Biochimie**, [S. l.], v. 89, n. 2, p. 205–212, 2007. DOI: 10.1016/j.biochi.2006.10.014.

TADA, M.; TAKAHAMA, Y.; ABE, K.; NAKATSUJI, N.; TADA, T. Nuclear reprogramming of somatic cells by *in vitro* hybridization with ES cells. **Current biology : CB**, [S. l.], v. 11, n. 19, p. 1553–8, 2001. DOI: 10.1016/s0960-9822(01)00459-6.

TAKAHASHI, Kazutoshi; TANABE, Koji; OHNUKI, Mari; NARITA, Megumi; ICHISAKA, Tomoko; TOMODA, Kiichiro; YAMANAKA, Shinya. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. **Cell**, [S. l.], v. 131, n. 5, p. 861–72, 2007. DOI: 10.1016/j.cell.2007.11.019.

TAKAHASHI, Kazutoshi; YAMANAKA, Shinya. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. **Cell**, [S. l.], v. 126, n. 4, p. 663–676, 2006. DOI: 10.1016/j.cell.2006.07.024.

TAKEHARA, Yuji et al. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. **Laboratory Investigation**, [S. l.], v. 93, n. 2, p. 181–193, 2013. DOI: 10.1038/labinvest.2012.167.

TANNETTA, Dionne; DRAGOVIC, Rebecca; ALYAHYAEI, Zahraa; SOUTHCOTBE, Jennifer. Extracellular vesicles and reproduction–promotion of successful pregnancy. **Cellular & Molecular Immunology**, [S. l.], v. 11, n. 6, p. 548–563, 2014. DOI: 10.1038/cmi.2014.42.

TAYLOR, Douglas D.; SHAH, Sahil. Methods of isolating extracellular vesicles impact downstream analyses of their cargoes. **Methods**, [S. l.], v. 87, p. 3–10, 2015. DOI: 10.1016/j.ymeth.2015.02.019.

TE VELDE, E. ..; SCHEFFER, G. ..; DORLAND, M.; BROEKMANS, F. ..; FAUSER, B. C. J. .. Developmental and endocrine aspects of normal ovarian aging. **Molecular and Cellular Endocrinology**, [S. l.], v. 145, n. 1–2, p. 67–73, 1998. DOI: 10.1016/S0303-7207(98)00171-3.

TERRACIANO, Paula et al. Cell Therapy for Chemically Induced Ovarian Failure in Mice. **Stem Cells International**, [S. l.], v. 2014, p. 1–8, 2014. DOI: 10.1155/2014/720753.

TESARIK, J.; MENDOZA, C. Nongenomic effects of 17 beta-estradiol on maturing human oocytes: relationship to oocyte developmental potential. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, [S. l.], v. 80, n. 4, p. 1438–1443, 1995. DOI: 10.1210/jcem.80.4.7714121.

TESARIK, Jan; GALÁN-LÁZARO, Maribel; MENDOZA-TESARIK, Raquel. Ovarian Aging: Molecular Mechanisms and Medical Management. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 1371, 2021. DOI: 10.3390/ijms22031371.

THÉRY, Clotilde et al. Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. **Journal of extracellular vesicles**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 1535750, 2018. DOI: 10.1080/20013078.2018.1535750.

THÉRY, Clotilde; OSTROWSKI, Matias; SEGURA, Elodie. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 9, n. 8, p. 581–593, 2009. DOI: 10.1038/nri2567.

THÉRY, Clotilde; ZITVOGEL, Laurence; AMIGORENA, Sebastian. Exosomes: composition, biogenesis and function. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 2, n. 8, p. 569–579, 2002. DOI: 10.1038/nri855.

TILL, J. E.; MCCULLOCH, E. A. Hemopoietic stem cell differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, [S. l.], v. 605, n. 4, p. 431–459, 1980. DOI: 10.1016/0304-419X(80)90009-8.

TITUS, Shiny et al. Impairment of BRCA1-Related DNA Double-Strand Break Repair Leads to Ovarian Aging in Mice and Humans. **Science Translational Medicine**, [S. l.], v. 5, n. 172, 2013. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004925.

TSUTSUMI, Makiko et al. Age-Related Decrease of Meiotic Cohesins in Human Oocytes. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. e96710, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0096710.

TULLI, Richard; LI, Wan-Ju; TUAN, Rocky S. Current state of cartilage tissue engineering. **Arthritis research & therapy**, [S. l.], v. 5, n. 5, p. 235–8, 2003. DOI: 10.1186/ar991.

UHLMANN, Frank; WERNIC, Dominik; POUPART, Marc-André; KOONIN, Eugene V; NASMYTH, Kim. Cleavage of Cohesin by the CD Clan Protease Separin Triggers Anaphase in Yeast. **Cell**, [S. l.], v. 103, n. 3, p. 375–386, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)00130-6.

URBANCZYK, Max; LAYLAND, Shannon L.; SCHENKE-LAYLAND, Katja. The role of extracellular matrix in biomechanics and its impact on bioengineering of cells and 3D tissues. **Matrix Biology**, [S. l.], v. 85–86, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1016/j.matbio.2019.11.005.

VALADI, Hadi; EKSTRÖM, Karin; BOSSIOS, Apostolos; SJÖSTRAND, Margareta; LEE, James J.; LÖTVALL, Jan O. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. **Nature Cell Biology**, [S. l.], v. 9, n. 6, p. 654–659, 2007. DOI: 10.1038/ncb1596.

VAN NIEL, Guillaume; D'ANGELO, Gisela; RAPOSO, Graça. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 213–228, 2018. DOI: 10.1038/nrm.2017.125.

VAN NIEL, Guillaume; PORTO-CARREIRO, Isabel; SIMOES, Sabrina; RAPOSO, Graça. Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. **The Journal of Biochemistry**, [S. l.], v. 140, n. 1, p. 13–21, 2006. DOI: 10.1093/jb/mvj128.

VATS, A.; BIELBY, RC; TOLLEY, NS; NEREM, R.; POLAK, JM. Stem cells. **The Lancet**, [S. l.], v. 366, n. 9485, p. 592–602, 2005. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)66879-1.

VIANA, J. H. M.; PALHAO, M. P.; SIQUEIRA, L. G. B.; FONSECA, J. F.; CAMARGO, L. S. A. Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. **Theriogenology**, [S. l.], v. 73, n. 7, p. 966–972, 2010. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2009.11.025.

VIANA, João Henrique M.; NASCIMENTO, Aparecida A.; PINHEIRO, Nádia L.; FERREIRA, Ademir M.; CAMARGO, Luiz S. A.; SÁ, Wanderlei F.; MARQUES JÚNIOR, Antônio P. Caracterização de seqüelas subseqüentes à punção folicular em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [S. l.], v. 23, n. 3, 2003. DOI: 10.1590/s0100-736x2003000300004.

VIZOSO, Francisco; EIRO, Noemi; CID, Sandra; SCHNEIDER, Jose; PEREZ-FERNANDEZ, Roman. Mesenchymal Stem Cell Secretome: Toward Cell-Free Therapeutic Strategies in Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 1852, 2017. DOI: 10.3390/ijms18091852.

WAGNER, Magdalena et al. Single-cell analysis of human ovarian cortex identifies distinct cell populations but no oogonial stem cells. **Nature Communications**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1147, 2020. DOI: 10.1038/s41467-020-14936-3.

WALTER HEAPE. III. Preliminary note on the transplantation and growth of mammalian ova within a uterine foster-mother. **Proceedings of the Royal Society of London**, [S. l.], v. 48, n. 292–295, p. 457–458, 1891. DOI: 10.1098/rspl.1890.0053.

WEISSMAN, Irving L. Stem Cells. **Cell**, [S. l.], v. 100, n. 1, p. 157–168, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81692-X.

WILMUT, I.; SCHNIEKE, A. E.; MCWHIR, J.; KIND, A. J.; CAMPBELL, K. H. S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. **Nature**, [S. l.], v. 385, n. 6619, p. 810–813, 1997. DOI: 10.1038/385810a0.

WITWER, Kenneth W. et al. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. **Journal of Extracellular Vesicles**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 20360, 2013. DOI: 10.3402/jev.v2i0.20360.

WOLLERT, Thomas; HURLEY, James H. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. **Nature**, [S. l.], v. 464, n. 7290, p. 864–9, 2010. DOI: 10.1038/nature08849.

WOOD, Charles D.; VIJAYVERGIA, Mayank; MILLER, Frank H.; CARROLL, Timothy; FASANATI, Charles; SHEA, Lonnie D.; CATHERINE BRINSON, L.; WOODRUFF, Teresa K. Multi-modal magnetic resonance elastography for noninvasive assessment of ovarian tissue rigidity *in vivo*. **Acta Biomaterialia**, [S. l.], v. 13, p. 295–300, 2015. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.11.022.

WOODRUFF, Teresa K.; SHEA, Lonnie D. A new hypothesis regarding ovarian follicle development: ovarian rigidity as a regulator of selection and health. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, [S. l.], v. 28, n. 1, p. 3–6, 2011. DOI: 10.1007/s10815-010-9478-4.

WU, R.; FUJII, S.; RYAN, N. K.; VAN DER HOEK, K. H.; JASPER, M. J.; SINI, I.; ROBERTSON, S. A.; ROBKER, R. L.; NORMAN, R. J. Ovarian leukocyte distribution and cytokine/chemokine mRNA expression in follicular fluid cells in women with polycystic ovary syndrome. **Human Reproduction**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 527–535, 2007. DOI: 10.1093/humrep/del371.

WUBBOLTS, Richard; LECKIE, Rachel S.; VEENHUIZEN, Peter T. M.; SCHWARZMANN, Guenter; MÖBIUS, Wiebke; HOERNSCHEMEYER, Joerg; SLOT, Jan-Willem; GEUZE, Hans J.; STOORVOGEL, Willem. Proteomic and Biochemical Analyses of Human B Cell-derived Exosomes. **Journal of Biological Chemistry**, [S. l.], v. 278, n. 13, p. 10963–10972, 2003. DOI: 10.1074/jbc.M207550200.

YAN, Meina et al. miR-146b promotes cell proliferation and increases chemosensitivity, but attenuates cell migration and invasion via FBXL10 in ovarian cancer. **Cell Death & Disease**, [S. l.], v. 9, n. 11, p. 1123, 2018. DOI: 10.1038/s41419-018-1093-9.

YANG, Meiling et al. Bone marrow mesenchymal stem cell-derived exosomal miR-144-5p improves rat ovarian function after chemotherapy-induced ovarian failure by targeting PTEN. **Laboratory Investigation**, [S. l.], v. 100, n. 3, p. 342–352, 2020. DOI: 10.1038/s41374-019-0321-y.

YOSHIDA, Kiyotsugu; MIKI, Yoshio. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Science**, [S. l.], v. 95, n. 11, p. 866–871, 2004. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2004.tb02195.x.

ZAKRZEWSKI, Wojciech; DOBRZYŃSKI, Maciej; SZYMONOWICZ, Maria; RYBAK, Zbigniew. Stem cells: past, present, and future. **Stem Cell Research & Therapy**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 68, 2019. DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5.

ZHANG, Wei et al. Cell-free therapy based on adipose tissue stem cell-derived exosomes promotes wound healing via the PI3K/Akt signaling pathway. **Experimental Cell Research**, [S. l.], v. 370, n. 2, p. 333–342, 2018. DOI: 10.1016/j.yexcr.2018.06.035.

ZHANG, Yun; ALEXANDER, Peter B.; WANG, Xiao-Fan. TGF- β Family Signaling in the Control of Cell Proliferation and Survival. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. a022145, 2017. DOI: 10.1101/cshperspect.a022145.

ZHAO, Yun-xia; CHEN, Shao-rong; SU, Ping-ping; HUANG, Feng-huang; SHI, Yan-chuan; SHI, Qi-yang; LIN, Shu. Using Mesenchymal Stem Cells to Treat Female Infertility: An Update on Female Reproductive Diseases. **Stem Cells International**, [S. l.], v. 2019, p. 1–10, 2019. DOI: 10.1155/2019/9071720.

ZWAAL, R. F.; SCHROIT, A. J. Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. **Blood**, [S. l.], v. 89, n. 4, p. 1121–32, 1997.