



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO DE SEQUELAS SUBSEQUENTES A  
ASPIRAÇÃO FOLICULAR E EFEITOS DO TRATAMENTO  
COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIAS E VESÍCULAS  
EXTRACELULARES SOBRE A POPULAÇÃO FOLICULAR  
OVARIANA EM BOVINOS**

**RÔMANY LOUISE RIBEIRO GONÇALVES**

**BRASÍLIA, DF**

**2025**

**RÔMANY LOUISE RIBEIRO GONÇALVES**

**CARACTERIZAÇÃO DE SEQUELAS SUBSEQUENTES A  
ASPIRAÇÃO FOLICULAR E EFEITOS DO TRATAMENTO  
COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIAS E VESÍCULAS  
EXTRACELULARES SOBRE A POPULAÇÃO FOLICULAR  
OVARIANA EM BOVINOS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

**Orientador: Dr. João Henrique Moreira Viana**

**BRASÍLIA, DF**

**2025**

**RÔMANY LOUISE RIBEIRO GONÇALVES**

**CARACTERIZAÇÃO DE SEQUELAS SUBSEQUENTES A  
ASPIRAÇÃO FOLICULAR E EFEITOS DO TRATAMENTO  
COM CÉLULAS TRONCO MESENQUIMAIAS E VESÍCULAS  
EXTRACELULARES SOBRE A POPULAÇÃO FOLICULAR  
OVARIANA EM BOVINOS**

Dissertação submetida ao programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em: **27/06/2025**

Banca examinadora:

Prof.º Dr. João Henrique Moreira Viana (Presidente)

Prof.ª Dra. Carolina Madeira Lucci (Membro titular)

Prof.º Dr. Paulo Henrique de Almeida Campos Júnior (Membro titular)

Suplente: Dr. Ricardo Alamino Figueiredo

**BRASÍLIA, DF**

**2025**

À minha família, que esteve presente em todos os momentos, me apoiando para que eu chegassem até aqui. Dedico este trabalho aos meus pais, Solange e Osvaldir, e a minha amada irmã, Guadalupe.

**“Entrega teu caminho ao Senhor, confie nEle, e Ele agirá”**  
*Salmos 37:5*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, cuja força e sabedoria me acompanharam durante toda a minha jornada acadêmica. Sou grata pela certeza de que sempre estive acompanhada, tendo bênçãos e luz em meu caminho, e pela coragem necessária para superar os desafios.

Agradeço à minha família, em especial aos meus pais, Solange e Osvaldir, por todo o amor, apoio incondicional e por sempre acreditarem em mim. Sua presença e suporte foram fundamentais para que eu chegasse até aqui. Agradeço também a minha irmã, Guadalupe, e a todos os familiares que me deram suporte emocional e motivacional durante todo o processo.

Um agradecimento especial à família Rocha Lima, que me acolheu nos meus momentos mais difíceis, me dando apoio, conforto e incentivo. Serei sempre grata a todas as conversas, ensinamentos e exemplos que vocês me dão. Muito obrigada tia Elaine, Manoel, Henrique e Manu.

Aos meus amigos, em especial Vitória Régia, Sarah, Henrique, Gustavo, Ana Maria, Ingrid M, Luana, Ingrid B, Elídio, Fernanda, William e Nicole, agradeço a amizade, conselhos, compreensão e pelas alegrias compartilhadas. Vocês foram essenciais para o meu equilíbrio e bem-estar, e sou grata por cada um de vocês.

Ao meu orientador, Dr. João Henrique, que contribuiu enormemente para minha formação acadêmica com ensinamentos valiosos, oportunidades, tranquilidade e instrução ao longo dos últimos anos. Muito obrigada pela confiança e gentileza!

Também sou grata à Universidade de Brasília e à Embrapa pelas oportunidades de aprendizado e por todas as pessoas que conheci nessa trajetória, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Estendo também o agradecimento a todos os profissionais de saúde que me acompanharam durante o período de realização deste trabalho. À minha psicóloga Cláudia Solano, agradeço pela escuta, conselhos e todo apoio que me prestou para que conseguisse vencer mais essa etapa da minha vida. A falta de saúde mental tem sido a grande barreira no meu desenvolvimento, e ter a clareza de que preciso de ajuda para superar essas limitações, que mesmo não sendo físicas me afetam tanto, foi fundamental para transpassar esse desafio. Sigo na luta!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para o sucesso desta caminhada, meu muito obrigada! Sem o apoio e incentivo de cada um, este trabalho não teria sido possível.

## ÍNDICE

Capítulos/subcapítulos	
RESUMO	x
ABSTRACT	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiv
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE FIGURAS	xvi
<b>CAPÍTULO 1:</b>	
<b>INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA</b>	1
1. INTRODUÇÃO GERAL	2
2. OBJETIVOS	4
2.1 Objetivo Geral	4
2.2 Objetivos Específicos	4
2.3 Hipótese	4
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	12
<b>CAPÍTULO 2:</b>	22
<b>Relato de caso: Achados clínicos e histopatológicos em vacas da raça Gir submetidas a aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal</b>	
1. RESUMO	23
2. ABSTRACT	24
3. INTRODUÇÃO	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
5. RESULTADOS	28
6. DISCUSSÃO	36
7. REFERÊNCIAS	38
<b>CAPÍTULO 3:</b>	43
<b>Efeito do tratamento com células-tronco mesenquimais ou microvesículas sobre as características histológicas ovarianas em fêmeas bovinas utilizadas como doadoras de oócitos</b>	
1. RESUMO	44

2. ABSTRACT	45
3. INTRODUÇÃO	46
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
5. RESULTADOS	52
6. DISCUSSÃO	56
7. REFERÊNCIAS	58

## RESUMO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) revolucionou a reprodução animal, representando uma ferramenta essencial para o avanço genético dos rebanhos. Seu desenvolvimento está diretamente associado à técnica de aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia (OPU), amplamente utilizada em programas de coleta de oócitos. No entanto, a repetição frequente desse procedimento pode provocar danos ao tecido ovariano, em função dos múltiplos traumas causados pela agulha de aspiração. Esse efeito cumulativo pode comprometer a função ovariana, sobretudo em fêmeas submetidas a protocolos intensivos de aspiração. Nas rotinas comerciais, a pressão por resultados tem intensificado o uso de doadoras, levando ao descarte precoce de fêmeas com alto valor genético devido a patologias ovarianas associadas à OPU. Nesse contexto, estudos experimentais com modelos animais indicam que o uso terapêutico de células-tronco mesenquimais (CTM) e vesículas-extracelulares (VE) pode contribuir para a recuperação da função ovariana em casos de lesão induzida. Este estudo teve como objetivo avaliar os danos clínicos e histopatológicos causados pela OPU nos ovários de doadoras bovinas submetidas a sucessivas OPU, bem como investigar o potencial efeito terapêutico das CTM e VE-CTM sobre as características histológicas ovarianas. No primeiro estudo foram avaliadas as consequências clínicas e histopatológicas observadas no ovário de vacas da raça Gir submetidas a sessões repetidas de OPU. Foram realizadas avaliações ultrassonográficas dos ovários e útero, dosagens plasmáticas de hormônio anti-Mülleriano (AMH) e análises macro e microscópicas dos ovários. No segundo estudo foram avaliados histologicamente ovários de vacas da raça Nelore submetidas à OPU, previamente utilizadas em estudo para análise do efeito *in vivo* da aplicação intraovariana de CTM ou VE-CTM. As doadoras foram distribuídas aleatoriamente em quatro grupos experimentais: controle (solução salina 0,9%), CTM, VE-CTM e hidrogel (veículo). As análises histológicas incluíram avaliação da densidade folicular (folículos primordiais, primários e secundários), da espessura da túnica albugínea e da proporção volumétrica dos componentes teciduais (tecido conjuntivo, folículos, tecido luteal e vasos sanguíneos). No primeiro estudo observou-se que o número de sessões de OPU esteve negativamente correlacionado com a recuperação de oócitos, sua viabilidade e a produção embrionária ( $P<0,01$ ). Clinicamente, 91,7% das doadoras apresentaram doença cística ovariana e 83,3% tinham mucometra. Alterações

macroscópicas, como aderências, foram identificadas em 16,7% dos ovários. Histologicamente, todos os ovários analisados exibiram graus variáveis de enrijecimento e deposição de colágeno, sendo essas alterações intensas em 82% dos casos. O segundo estudo, constatou que a aplicação de CTM e VE-CTM não resultou em diferenças significativas na densidade de folículos primordiais e primários entre os grupos. Contudo, o grupo tratado com hidrogel apresentou maior densidade de folículos secundários em comparação ao controle ( $P<0,05$ ). As proporções volumétricas de tecido conjuntivo, folículos, tecido luteal e vasos sanguíneos, bem como a espessura da túnica albugínea, não diferiram significativamente entre os grupos. Os achados do primeiro estudo indicam que a realização frequente de OPU pode comprometer progressivamente a função reprodutiva em vacas Gir, destacando a importância de estratégias de manejo que visem preservar a saúde reprodutiva e a longevidade produtiva dessas doadoras. Em vacas doadoras de óocitos a aplicação intraovariana de CTM e VE-CTM é uma técnica segura, sem aparentes impactos negativos sobre os ovários e sua composição tecidual.

Palavras-chave: produção *in vitro* de embriões, aspiração folicular, células-tronco mesenquimais, avaliação clínica, avaliação macroscópica, histopatologia, lesão ovariana, bovino.

## **ABSTRACT**

*In vitro* embryo production (IVEP) has revolutionized animal reproduction, representing an essential tool for the genetic improvement of herds. Its development is directly associated with the technique of transvaginal ultrasound-guided follicular aspiration (OPU), which is widely used in oocyte collection programs. However, the frequent repetition of this procedure can cause damage to ovarian tissue due to multiple traumas caused by the aspiration needle. This cumulative effect may impair ovarian function, especially in females subjected to intensive aspiration protocols. In commercial settings, the pressure for results has intensified the use of donors, leading to the early culling of genetically valuable females due to ovarian pathologies associated with OPU. In this context, experimental studies using animal models indicate that the therapeutic use of mesenchymal stem cells (MSCs) and MSC-derived extracellular vesicles (MSC-EVs) may contribute to the recovery of ovarian function in cases of induced injury. This study aimed to evaluate the clinical and histopathological damage caused by OPU in the ovaries of bovine donors subjected to successive OPU sessions, as well as to investigate the potential therapeutic effect of MSCs and MSC-EVs on ovarian histological characteristics. In the first study, clinical and histopathological consequences were assessed in the ovaries of Gir cows subjected to repeated OPU sessions. Ultrasonographic evaluations of the ovaries and uterus, plasma anti-Müllerian hormone (AMH) levels, and macro- and microscopic analyses of the ovaries were conducted. In the second study, ovaries of Nelore cows previously used in an *in vivo* study on the effect of intraovarian application of MSCs or MSC-EVs were histologically evaluated. Donors were randomly assigned to four experimental groups: control (0.9% saline solution), MSCs, MSC-EVs, and hydrogel (vehicle). Histological analyses included the assessment of follicular density (primordial, primary, and secondary follicles), tunica albuginea thickness, and the volumetric proportion of tissue components (connective tissue, follicles, luteal tissue, and blood vessels). In the first study, it was observed that the number of OPU sessions was negatively correlated with oocyte recovery, viability, and embryo production ( $P < 0.01$ ). Clinically, 91.7% of the donors presented with ovarian cystic disease, and 83.3% had mucometra. Macroscopic alterations such as adhesions were identified in 16.7% of the ovaries. Histologically, all analyzed ovaries showed varying degrees of hardening and collagen deposition, with severe changes observed in 82% of cases. In the second study, the application of MSCs

and MSC-EVs did not result in significant differences in the density of primordial and primary follicles among groups. However, the group treated with hydrogel showed a higher density of secondary follicles compared to the control group ( $P < 0.05$ ). The volumetric proportions of connective tissue, follicles, luteal tissue, and blood vessels, as well as the thickness of the tunica albuginea, did not differ significantly among the groups.

The findings of the first study indicate that frequent OPU procedures may progressively impair reproductive function in Gir cows, highlighting the importance of management strategies aimed at preserving reproductive health and productive longevity in these donors. In oocyte donor cows, intraovarian application of MSCs and MSC-EVs is a safe technique with no apparent negative impact on the ovaries and their tissue composition.

**Keywords:** *in vitro* embryo production, follicular aspiration, mesenchymal stem cells, clinical evaluation, macroscopic evaluation, histopathology, ovarian injury, cattle.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

- AMH - Hormônio anti-Mülleriano  
CD11b - Cluster de diferenciação 11b  
CD14 - Cluster de diferenciação 14  
CD19 - Cluster de diferenciação 19  
CD34 - Cluster de diferenciação 34  
CD45 - Cluster de diferenciação 45  
CD73 - Cluster de diferenciação 73  
CD90 - Cluster de diferenciação 90  
CD150 - Cluster de diferenciação 150  
CD79 $\alpha$  - Cluster de diferenciação 79  $\alpha$   
CFA - Contagem de folículos antrais  
CL - Corpo lúteo  
COC - Complexo cumulus-oócito  
CTM - Célula tronco mesenquimal  
cv. - Cultivar  
DOC - Doença ovariana cística  
FSH - Hormônio folículo estimulante  
HE - Hematoxilina-Eosina  
HLA-DR - Antígeno leucocitário humano DR (*Human Leukocyte Antigen DR*)  
IL-1 - Interleucina 1  
IL-2 - Interleucina 2  
LH - Hormônio luteinizante  
OPU - Aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal (*Ovum pick-up*)  
PBS - Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)  
PFA - Paraformaldeído  
PIVE - Produção *in vitro* de embriões  
VE - Vesícula extracelular  
VE-CTM - Vesícula extracelular derivada do cultivo de células tronco mesenquimais

## **LISTA DE TABELAS**

Número	Título	Página
	<b>CAPÍTULO 2:</b> <i>Relato de caso: Achados clínicos e histopatológicos em vacas da raça Gir submetidas a aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal</i>	
1	Histórico dos resultados da OPU-PIVE nas doadoras Gir utilizadas no estudo.	40
2	Resultado do exame ginecológico e da dosagem de AMH nas doadoras Gir utilizadas no estudo.	41
3	Avaliação macroscópica <i>post-mortem</i> de ovários de vacas da raça Gir utilizadas como doadoras de oócitos e subsequentemente destinadas ao descarte por baixa produção de embriões.	42
4	Caracterização microscópica de lesões observadas em doadoras Gir submetidas à OPU.	45

## LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
	<b>CAPÍTULO 2:</b> <i>Relato de caso: Achados clínicos e histopatológicos em vacas da raça Gir submetidas a aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal</i>	
1	Relação entre número de aspirações e os resultados da OPU e PIVE em doadoras da raça Gir.	40
2	Relação entre número de oócitos recuperados por OPU e concentração circulante de AMH em doadoras Gir.	42
3	Alterações macroscópicas observadas em ovários de vacas submetidas à repetidas sessões de OPU.	44
4	Alterações histopatológicas observadas em ovários de vacas submetidas a repetidas sessões de OPU.	46
	<b>CAPÍTULO 3:</b> <i>Efeito do tratamento com células-tronco mesenquimais ou microvesículas sobre as características histológicas ovarianas em fêmeas bovinas utilizadas como doadoras de oócitos</i>	
5	Classificação folicular.	59
6	Exemplo de fotomicrografia utilizada para mensuração da espessura da túnica albugínea.	61
7	Componentes ovarianos analisados no estudo de proporção volumétrica, indicados por setas.	62
8	Quantificação da população folicular nos grupos experimentais.	64
9	Proporção volumétrica dos componentes ovarianos avaliados.	65
10	Avaliação da espessura da túnica albugínea entre os grupos experimentais	66

## **CAPÍTULO 1**

### **INTRODUÇÃO, OBJETIVOS E REVISÃO DE LITERATURA**

## **1. INTRODUÇÃO GERAL**

O desenvolvimento da produção *in vitro* de embriões (PIVE) revolucionou tanto a produção animal quanto a clínica reprodutiva humana. Em 2016, a produção mundial de embriões bovinos *in vitro* superou a produção *in vivo* (por superovulação), tornando-se a biotecnologia reprodutiva de eleição para produção de embriões bovinos (Perry, 2017). A PIVE é uma técnica de grande importância para o avanço genético dos rebanhos (Viana et al., 2017). O uso comercial da PIVE, tanto na reprodução humana quanto na animal, esteve diretamente associado ao desenvolvimento da técnica de aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal, também conhecida como *Ovum Pick-Up* (OPU). Esta técnica possibilita a coleta de óócitos minimizando os riscos e efeitos colaterais para as doadoras, uma vez que não é necessária a realização de cirurgia ou laparoscopia para acessar os ovários (Kruip et al., 1994; Santl et al., 1998).

A OPU tornou-se a técnica de eleição para obtenção de óócitos destinados a PIVE, respondendo por 98,8% de todos os embriões bovinos produzidos *in vitro* no mundo (Viana, 2018). No entanto, mesmo sendo pouco invasiva, esta técnica também causa danos ao tecido ovariano, devido às repetidas perfurações pela agulha de aspiração. O uso da OPU foi associado ao espessamento do epitélio ovariano, à presença de aderências, infiltrados de células inflamatórias e fibrose, em intensidade proporcional ao número de sessões de aspiração ao qual a doadora foi submetida (Petyim et al., 2000; Viana et al., 2003).

O trauma ocasionado pelo procedimento pode resultar na perda da função ovariana, especialmente em fêmeas submetidas a um regime de aspiração constante. Esse problema vem se agravando pela pressão por resultados nas rotinas comerciais, e muitos animais têm sido descartados precocemente por patologias ovarianas associadas ao uso intensivo como doadoras de óócitos, incluindo animais com grande valor genético. O processo inflamatório crônico subsequente à OPU causa a liberação de mediadores do processo inflamatório (como as IL1 e IL2) que podem alterar a dinâmica de recrutamento folicular e a qualidade dos óócitos em doadoras frequentemente aspiradas (Uri-Belapolsky et al., 2017).

O uso de células-tronco mesenquimais (CTM) e de vesículas extracelulares derivadas do cultivo das CTM (VE-CTM) têm se mostrado eficaz na terapia de diversos processos inflamatórios agudos ou crônicos (Lindroos et al., 2011; Rani et al., 2015).

As CTM têm a capacidade de produzir citocinas que modulam o processo inflamatório e minimizam o dano tecidual causado pela inflamação (Caplan, 2009), já as VE-CTM atuam como importantes mediadores da comunicação transcelular, e têm efeito terapêutico similares aos das CTM pela liberação de proteínas, lipídeos, mRNA, e microRNA (Ratajczak et al., 2006; Zhang et al., 2016). Essas características podem ser úteis no tratamento de doadoras de óócitos em sistemas de aspiração intensivos, uma vez que poderiam reduzir os efeitos inflamatórios deletérios e consequentemente a fibrose e perda de função ovariana. Estudos prévios demonstraram que o tratamento com CTM em animais de laboratório com dano ovariano induzido, foi eficiente em restabelecer a função ovariana (Takehara et al., 2012; Abd-Allah et al., 2013; Lai et al., 2014; Elfayomy et al., 2016; Mohamed et al., 2017). Entretanto, o uso terapêutico em animais de grande porte permanece controverso (Chang et al., 2017; Grady et al., 2019). Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstraram que o tratamento de doadoras com CTM resultou em aumento do número de folículos antrais presentes nos ovários após duas semanas, resultando em aumento no número de óócitos aspirados e de embriões produzidos (Malard et al., 2020). Entretanto, o mecanismo determinante para este efeito não foi esclarecido.

As terapias com CTM e VE-CTM vêm sendo investigadas no tratamento de diversas condições inflamatórias e degenerativas, tanto na medicina humana quanto veterinária. No contexto da reprodução, essas terapias têm demonstrado potencial na reversão da falência ovariana, especialmente em pacientes com histórico oncológico. Fêmeas bovinas doadoras de óócitos representam um modelo promissor para o estudo dos efeitos das CTM ou VE-CTM sobre a função ovariana, uma vez que frequentemente desenvolvem processos inflamatórios crônicos induzidos pela aspiração folicular repetida — condição que compromete a produção de embriões e leva ao descarte precoce por infertilidade. Assim, além de contribuir para a preservação da função ovariana nesses animais, a utilização de CTM ou VE-CTM em bovinos pode fornecer informações valiosas para futuras aplicações terapêuticas em humanos. No entanto, ainda são necessários mais estudos para elucidar os mecanismos de ação das CTM e VE-CTM sobre o tecido ovariano.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

- Relatar achados clínicos e histopatológicos dos danos causados pela OPU no ovário e o potencial efeito do tratamento com células-tronco mesenquimais e vesículas-extracelulares provenientes do cultivo de CTM sobre as características histológicas dos ovários.

### **2.2. Específicos**

- Caracterizar histologicamente as lesões provocadas pela técnica de OPU;
- Descrever os achados clínicos e histopatológicos dos ovários de doadoras submetidas a OPU;
- Avaliar o efeito do tratamento com CTM e VE-CTM sobre as populações foliculares dos ovários de vacas Nelore;
- Avaliar a espessura da túnica albugínea e a proporção volumétrica dos diferentes componentes histológicos dos ovários.

### **2.3. Hipótese**

O tratamento com CTM e VE-CTM influencia na população de folículos ovarianos em início de crescimento e de categorias iniciais.

## **3. REVISÃO DE LITERATURA**

### **3.1 Aspectos estruturais do ovário bovino**

Os ovários são órgãos pares que desempenham função endócrina (esteroidogênese) e exócrina (gametogênese). Nos ruminantes se localizam no terço ventral cavidade abdominal, cranialmente à pelve e são suspensos por uma ramificação do ligamento largo, o mesovário. Em bovinos têm formato de amêndoia/avelã, ovais e aplanados lateralmente, com tamanho variando de 3,0 a 4,5 cm de comprimento, de 1,5 a 2,0 cm de largura e de 2,0 a 2,8 cm de profundidade, a depender da fase do ciclo estral que a fêmea se encontra (Sisson & Grossman, 1981; Ball & Peters, 2004; Hafez & Hafez, 2004; König & Liebich, 2016).

O epitélio germinativo é a primeira camada que recobre o ovário, sendo composto por células cúbicas simples. Logo abaixo está uma camada de tecido conjuntivo denso, a túnica albugínea. O tecido ovariano é dividido em duas regiões: a

região externa denominada córtex e a região interna chamada medula. O córtex é composto por estroma, folículos ovarianos e corpos lúteos em diferentes estágios de desenvolvimento. Dentro de cada folículo há apenas um oócito; o corpo lúteo é formado após ruptura do folículo ovulatório que libera o oócito (chamada de ovulação). A medula é composta por tecido conjuntivo frouxo, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Bacha Jr & Bacha, 2003; Junqueira & Carneiro, 2013; König & Liebich, 2016; Ross & Pawlina, 2016).

### **3.2 Foliculogênese bovina**

A Foliculogênese em bovinos se inicia após a migração das células germinativas primordiais para a crista genital, ainda no período fetal, culminando na formação do folículo primordial (Aerts & Bols, 2010). Os folículos ovarianos podem ser classificados em cinco categorias: primordial, primário, secundário, antral e atrésico (Pereira et al., 2020).

O folículo primordial é caracterizado por um oócito imaturo circundado por uma única camada de células da pré-granulosa achatadas, esses folículos são a reserva de gametas da fêmea e se situam no córtex ovariano de modo quiescente até a retomada de seu crescimento, processo denominado ativação. O crescimento folicular ocorre de forma contínua durante toda a vida da fêmea ou até o esgotamento da reserva (Mayer et al., 2004; Aerts & Bols, 2010; Junqueira & Carneiro, 2013; Seneda et al., 2021).

A ativação do folículo primordial para o pool de crescimento é regulada pelo equilíbrio entre estimulação e inibição de fatores intraovarianos, moleculares e sistêmicos (Fortune, 2003; Van der Hur & Zhao, 2005; Aerts & Bols, 2010), e o crescimento folicular na fase pré-natal não é dependente de gonadotrofinas (Cox & Takov, 2021; Seneda et al., 2021).

A transição de folículo primordial para folículo primário é caracterizada principalmente pela alteração da morfologia da camada única de células da granulosa que circundam o oócito, que passam a ser cuboidais e pelo início da secreção de glicoproteínas pelo oócito que formarão a zona pelúcida (van der Hur & Zhao, 2005; Aerts & Bols, 2010; Junqueira & Carneiro, 2013; Seneda et al., 2021). A partir desse estágio a interação entre as células da granulosa e o oócito, mediada por endocitose (Lucci et al., 2001) torna-se fundamental para a proliferação e diferenciação das células da granulosa e para o crescimento folicular (Gilchrist et al., 2004). Nessa fase

também se inicia a expressão de receptores para FSH (Oktay et al., 1997; Cox & Takov, 2021).

De folículo primário para secundário as principais mudanças observadas são: a proliferação das células da granulosa com formação de duas ou mais camadas, espessamento da zona pelúcida, crescimento do oócito, surgimento das células da teca e expressão de receptores para LH (Lucci et al., 2001; Van der Hurk & Zhao, 2005; Aerts & Bols, 2010; Cox & Takov, 2021). O crescimento do folículo nessa fase ocorre de maneira simultânea ao do oócito, sendo a interação entre o oócito e as células da granulosa (via junções GAP e endocitose) essencial para que o desenvolvimento folicular prossiga (Lucci et al., 2001; Kidder & Mhawi, 2002).

A transição do estágio pré-antral para antral é marcada pela formação do antro, dependência dos folículos as gonadotrofinas e pelo desenvolvimento de competência meiótica pelo oócito (Eppig, 2001; Van der Hurk & Zhao, 2005). Os folículos antrais são caracterizados pela presença do antro, uma cavidade preenchida por fluido folicular e pela presença de múltiplas camadas de células da granulosa ( $>250$  cél.) (Smits & Cortvriendt, 2002; Van der Hurk & Zhao, 2005). Após a formação do antro, as células da granulosa podem ser classificadas em duas categorias: células da granulosa murais (recobrem a parede folicular) e células do *cumulus* (ligadas ao oócito) (Eppig, 2001).

Cada onda de crescimento folicular na vaca, geralmente de 2 a 3 ondas, pode ser subdividida em três fases: recrutamento, seleção e dominância (Van der Hurk & Zhao, 2005; Adams et al., 2008; Aerts & Bols, 2010). O recrutamento ocorre quando há elevação dos níveis séricos de FSH, geralmente após ovulação ou regressão do folículo dominante. Esse aumento permite que um grupo de folículos antrais pequenos continue seu desenvolvimento e escape da atresia (Hirshfield, 1991; Fortune, 1994; Van der Hurk & Zhao, 2005; Adams et al., 2008; Aerts & Bols, 2010).

Os folículos em crescimento produzem estradiol e inibina que geram um *feedback* negativo para a produção de FSH. A seleção ocorre após o declínio dos níveis circulantes de FSH, os folículos que forem capazes de continuar seu crescimento com níveis basais de FSH seguem seu desenvolvimento, os outros se tornam subordinados e regredem (Hirshfield, 1991; Van der Hurk & Zhao, 2005; Adams et al., 2008; Aerts & Bols, 2010). Durante o processo de dominância, o folículo dominante, geralmente o maior do grupo na ocasião do recrutamento, adquire mais receptores para LH nas células da granulosa que seus subordinados, sendo capaz assim de alternar sua dependência do FSH para o LH. O LH tem sua secreção pulsátil

controlada por *feedback* positivo pelo estradiol (produzido pelo folículo dominante) e negativo pela progesterona (produzida pelo corpo lúteo). Quando não há corpo lúteo ativo, os níveis de progesterona diminuem permitindo o pico de LH e consequentemente a ovulação. Caso o folículo dominante atinja seu desenvolvimento máximo na presença de corpo lúteo ativo ele entra em atresia e uma nova onda se inicia (Ginther et al., 2003; Van der Hurk & Zhao, 2005; Adams et al., 2008; Aerts & Bols, 2010; Scaramuzzi et al., 2011; Cox & Takov, 2021).

### **3.3 A técnica de aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal (OPU)**

O desenvolvimento da técnica de aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal (OPU) permitiu a coleta de óócitos de doadoras vivas de maneira mais viável, segura e vantajosa (Pieterse et al., 1988). Como etapa essencial para realização da produção *in vitro* de embriões (PIVE), a coleta de óócitos era realizada *in vivo* por laparoscopia (Lambert et al., 1983; Lambert et al., 1986) ou *ex vivo* por aspiração de ovários provenientes de abatedouro (Goto et al., 1988). A técnica cirúrgica, embora passível de ser repetida, requer anestesia e é traumática, causando fibrose e aderências no trato genital das doadoras. Já a coleta de óócitos por aspiração de ovários de abatedouro não pode ser repetida para um mesmo animal, é pouco segura do ponto de vista sanitário, uma vez que o histórico dos animais é desconhecido na maioria dos casos.

A OPU surgiu como alternativa não-cirúrgica e competitiva para coleta de óócitos imaturos para a PIVE, uma vez que permite coletas seriadas em fêmeas de diferentes perfis reprodutivos, sem aparente comprometimento da fertilidade da doadora e sem a necessidade de estimulação hormonal prévia (Pieterse et al., 1991). Esta técnica viabilizou a implementação comercial da PIVE em programas de melhoramento genético (Kruip et al., 1994).

Como descrito por Pieterse et al. (1988 e 1991), a técnica consiste em aspirar os folículos ovarianos de 3 mm a 10 mm com auxílio de guia para agulha acoplada à sonda do transdutor do ultrassom. Após imobilização em tronco de contenção e aplicação de anestesia epidural com lidocaína 2%, a região perineal é limpa externamente. A sonda-guia é então inserida na vagina do animal e posicionada no fundo de saco vaginal, adjacente ao lado direito ou esquerdo da cérvix. O técnico manipula o ovário ipsilateral à sonda por via retal e o coloca próximo ao transdutor,

onde os folículos são visualizados e aspirados. A agulha de aspiração é conectada a um circuito com pressão de vácuo de 80 a 100 mmHg, o fluido aspirado é depositado em um tubo aquecido com PBS acrescido de heparina, para posterior envio ao laboratório.

### **3.4 Problemas associados ao uso da OPU**

O procedimento de aspiração folicular, embora menos traumático e de maior repetibilidade que a laparoscopia (Santl et al., 1998), pode lesionar os ovários das doadoras de maneira proporcional ao número de sessões e punções realizadas (Viana et al., 2003). Alterações morfológicas e funcionais como espessamento da túnica albugínea, aderências, fibrose de estroma (cicatrizes no percurso da agulha), desorganização tecidual, infiltrado de células inflamatórias, alteração de consistência (enrijecimento) e pontos hemorrágicos nos ovários aspirados de fêmeas bovinas foram relatadas em estudos prévios (Van der Schans et al., 1991; Petyim et al., 2000; Petyim et al., 2001; Viana et al., 2003 Viana et al., 2006).

Alguns fatores técnicos, como a habilidade do profissional, o diâmetro da agulha, o tamanho do bisel e a pressão aplicada ao sistema de aspiração influenciam o sucesso da OPU, e os possíveis danos causados ao ovário (Seneda & Blaschi, 2004). A manifestação de estro pode ser alterada durante períodos contínuos de realização da OPU, as alterações endocrinológicas são leves e há retorno à normalidade em poucos dias após o fim das aspirações (Petyim et al., 2000; Petyim et al., 2001). Contudo, o número de folículos disponíveis e oócitos recuperados após longos períodos contínuos de aspiração tende a declinar (Monteiro et al., 2017; Stubbings & Walton, 1994).

Apesar de realizadas repetidas sessões de OPU o procedimento não causa alteração no bem-estar dos animais. Foram observados sinais leves de estresse agudo, sem diferença estatística do grupo controle, no qual foi realizado procedimento de rotina ginecológica (Chastant-Maillard et al., 2003).

### **3.5 O ovário aspirado como modelo para falência ovariana**

O estudo da fisiologia ovariana e o acesso ao tecido ovariano de mulheres férteis saudáveis é difícil por questões éticas e logísticas que envolvem a experimentação (análises seriadas e/ou prolongadas, coleta frequente de amostras,

procedimentos invasivos). Também há a questão da proibição da realização de experimentos que possam comprometer a fertilidade futura da mulher.

O uso de roedores como modelos animais é amplamente implementado no meio científico, porém, para pesquisa comparativa em reprodução seu uso é limitado devido ao tamanho corporal pequeno, dificuldade de realizar experimentos *in vivo* e diferenças na fisiologia ovariana (i.e., são poliovulatórias). Diante disso, o uso de grandes mamíferos, como as fêmeas bovinas, surgiu como uma alternativa viável, prática e mais representativa da fisiologia ovariana de espécies monovulatórias (Campbell et al., 2003; Adams et al., 2012; Sirard, 2017).

A vaca e a mulher compartilham características entre seus ciclos reprodutivos: ambas são policíclicas monovulatórias, os ovários têm tamanho e morfologia semelhantes, o período de gestação e duração do ciclo estral/menstrual são próximos, além de sofrerem de patologias reprodutivas similares (Adams & Pierson, 1995; Malhi et al., 2005; Sirard, 2017).

Como modelo validado para estudo da dinâmica folicular, fisiologia ovariana e desenvolvimento do oócito, a vaca pode ser útil também como modelo para o estudo da infertilidade (Adams et al., 2012; Malhi et al., 2005; Sirard, 2017; Rovani et al., 2017). Fêmeas bovinas que participam de programas de aspiração constantes podem ser bons modelos para pesquisa de terapias e protocolos para falhas reprodutivas em humanos, uma vez que o procedimento de aspiração folicular a longo prazo causa falência ovariana.

### **3.6 Células-tronco mesenquimais (CTM) e vesículas extracelulares provenientes do cultivo de CTM**

Primeiramente encontradas na medula óssea (Friedenstein et al., 1976), as células tronco mesenquimais (CTM) podem ser definidas por células não hematopoiéticas, auto proliferativas, com capacidade de diferenciação e regeneração em tecidos mesenquimais (multipotentes) (Chamberlain et al., 2007; Gugjoo et al., 2018).

A Sociedade Internacional de Terapia Celular (ISCT) definiu como critério mínimo para a caracterização de CTM os seguintes itens: aderência na placa quando mantida em condições de cultura padrão; expressão de CD105, CD73 e CD90, e ausência de expressão de CD45, CD34, CD14 ou CD11b, CD79α ou CD19 e moléculas de superfície HLA-DR; deve se diferenciar em osteoblastos, adipócitos e condroblastos

*in vitro*. Contudo, a espécie e tecido da qual as CTM são isoladas pode influenciar na expressão dos marcadores de superfície (Dominici et al., 2006; Chamberlain et al., 2007).

Por serem abundantes, de fácil acesso e coleta minimamente invasiva as CTM derivadas do tecido adiposo são excelentes candidatas ao uso terapêutico. Em bovinos foram isoladas, cultivadas e caracterizadas quanto ao seu potencial multipotente e morfologia com sucesso (Lu et al., 2014; Sampaio et al., 2015; Malard et al., 2020). Além da multipotência, as CTM têm propriedades imunomodulatórias, anti-inflamatórias, tropismo por tecidos inflamados e baixa imunogenicidade. As aplicações na espécie bovina são promissoras abrangendo patologias locomotoras, reprodutivas, metabólicas e uso em biotecnologias reprodutivas como a transferência nuclear de células somáticas (Caplan, 2009; Lu et al., 2014; Glenn & Whartenby., 2014; Sampaio et al., 2015; Gugjoo et al., 2018; Hill et al., 2019; Malard et al., 2020).

Como a maioria das células, as CTM liberam microvesículas e exossomos, chamadas de vesículas extracelulares (VE). Essas VE desempenham importante papel como veículos de comunicação intercelular, localmente e à distância (Raposo & Stoorvogel,. 2013). A Sociedade Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) categoriza as VE como “partículas que são liberadas das células, delimitadas por uma bicamada lipídica e não podem se replicar por conta própria”, as vesículas têm tamanho aproximado de ~20 nm a >1 µm, e são divididas em subpopulações: os exossomos, as microvesículas e os corpos apoptóticos, sendo essa divisão vista como simplista, hoje a nomenclatura adotada pela comunidade científica é “vesículas extracelulares”. A ISEV desenvolveu diretrizes metodológicas visando padronizar as práticas do campo. A diretriz mais recente, intitulada MISEV2023 (*Minimal Information for Studies of Extracellular Vesicles*), amplia os critérios estabelecidos nas versões anteriores (2014 e 2018), fornecendo orientações abrangentes para o isolamento, caracterização e estudo funcional das VEs (Welsh et al., 2024).

A análise de marcadores moleculares para caracterização, validação da pureza e identidade das VEs é feita com baseada em três categorias: (1) proteínas transmembrana e citoplasmáticas associadas a VEs (como CD9, CD63, CD81 e TSG101); (2) proteínas enriquecidas em outros compartimentos celulares (como GRP94, calnexina ou GM130), usadas como controles negativos para avaliar a presença de contaminantes; e (3) marcadores específicos do tipo celular ou condição de origem. A caracterização deve ainda considerar o uso de técnicas que ofereçam

tanto uma visão populacional (como espectrometria de massas, Western blot e nanoparticle tracking analysis) quanto análises em nível de partícula única, como citometria de fluxo, microscopia eletrônica e métodos baseados em interferometria (Welsh et al., 2024).

O uso das VE-CTM, emerge como ferramenta terapêutica promissora na medicina regenerativa. Por serem capazes de carregar moléculas biologicamente ativas e transferi-las para células-alvo, as VE-CTM demonstram efeitos benéficos como regeneração de tecidos, modulação do sistema imune e supressão de respostas inflamatórias. Dada a facilidade de obtenção, segurança e baixo custo, essas moléculas representam uma alternativa viável e eficiente às terapias celulares com CTMs. No entanto, a validação de sua eficácia e segurança ainda exige estudos rigorosos e padronizados (Zhang et al., 2016; Loft et al., 2023).

### **3.7 Uso de CTM e VE-CTM no tratamento de ovários submetidos a OPU**

Diversas patologias podem causar a infertilidade feminina, afetando a qualidade de vida de muitas mulheres e casais ao redor do mundo. O uso das CTM tem sido avaliado em diversos modelos animais como estratégia para o tratamento da infertilidade e falência ovariana (Esfandyari et al., 2020). Os mecanismos de ação das CTM não são totalmente conhecidos, mas sabe-se que têm capacidade de liberar fatores e mediadores que modulam o processo inflamatório, promovem regeneração, reparo tecidual e imunomodulação (Caplan, 2009; Abd-Allah et al., 2013).

A aplicação de CTM têm se mostrado eficaz no tratamento e até reversão da infertilidade feminina em modelos animais com falência ovariana induzida (Abd-Allah et al., 2013; Mohamed et al., 2017; Liu et al., 2019; Yoon et al., 2020). No entanto, ainda são necessários mais estudos para demonstrar a segurança e eficiência do uso de CTM na medicina reprodutiva humana (Sheikhansari et al., 2018; Esfandyari et al., 2020; Saha et al., 2021). O uso do secretoma de CTM tem sido proposto para terapias regenerativas devido às suas propriedades reparadoras, mediadas por meio de mecanismos parácrinos (Makridakis et al., 2013). O uso de VE-CTM em modelos de falência ovariana demonstrou potencial terapêutico na recuperação da função ovariana, atuando na inibição da apoptose (Sun et al., 2017), promoção da proliferação de células da granulosa (Huang et al., 2018), manutenção da produção de óocitos e elevação da produção de embriões *in vitro* (Barcelos et al., 2024).

O emprego do modelo com grandes animais para estudo da terapia com CTM e VE-CTM sobre a infertilidade é interessante, uma vez que a fisiopatologia reprodutiva entre humanos e bovinos é mais similar do que quando comparada à roedores (Zhao et al., 2019). Os ovários de doadoras submetidas a OPU podem ser modelos valiosos de falência ovariana. Nesse cenário, após repetidas sessões, a fertilidade e qualidade dos oócitos dessas fêmeas declina. O tratamento com CTM foi eficaz em melhorar as taxas de recuperação de oócitos e produção *in vitro* de embriões nos ovários de vacas com lesões agudas causadas por OPU, no entanto, em fêmeas com lesões crônicas não apresentaram o mesmo resultado (Malard et al., 2020).

O uso de CTM e seus derivados, como as VE-CTM, representam uma abordagem inovadora e promissora no enfrentamento da infertilidade feminina associada à falência ovariana, inclusive em modelos clínicos relevantes, como fêmeas submetidas a múltiplas sessões de OPU. Ainda que resultados positivos tenham sido observados em casos de lesões ovarianas agudas, a resposta limitada em condições crônicas ressalta a necessidade de aprofundar os estudos quanto aos mecanismos de ação, tempo de aplicação e estratégias de otimização terapêutica. A continuidade das pesquisas, especialmente em modelos animais com maior similaridade reprodutiva aos humanos, é essencial para validar a segurança, eficácia e viabilidade clínica dessas terapias regenerativas no contexto da medicina reprodutiva.

#### **4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, El-Shal AS, Raafat N, Shabrawy SM, Awad HA, Amer MG, Gharib MA, El Gendy EA, Raslan AA, El-Kelawy HM. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy* 2013;15(1):64-75.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.08.001>.
- Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P. Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. *Theriogenology* 2008;69(1):72-80.  
<https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.09.026>.
- Adams GP & Pierson RA. Bovine model for study of ovarian follicular dynamics in humans. *Theriogenology* 1995; 43(1): 113-120. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)00015-m](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)00015-m).

Adams GP, Singh J, Baerwald AR. Large animal models for the study of ovarian follicular dynamics in women. *Theriogenology* 2012;78(8):1733-48. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2012.04.010>.

Aerts JM & Bols PE. Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. *Reprod Domest Anim* 2010;45(1):171-9. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01302.x>.

Aerts JM & Bols PE. Ovarian follicular dynamics. A review with emphasis on the bovine species. Part II: Antral development, exogenous influence and future prospects. *Reprod Domest Anim* 2010;45(1):180-7. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2008.01298.x>.

Bacha Jr. WJ & Bacha LM. *Atlas Colorido de Histologia Veterinária*, 2 ed. Roca, 2003. ISBN: 9788572414395.

Ball PJH & Peters AR. *Reproduction in cattle*. 3 ed. Blackwell Pub. 2004. ISBN: 9781405115452.

Barcelos SM, da Silva Rosa PM, Moura ABB, Villarroel CLP, Bridi A, Bispo ECI, Carvalho JL. Extracellular vesicles derived from bovine adipose-derived mesenchymal stromal cells enhance in vitro embryo production from lesioned ovaries. *Cytotherapy* 2024; 26(10):1141-1151.

Campbell BK, Souza C, Gong J, Webb R, Kendall N, Marsters P, Robinson G, Mitchell A, Telfer EE, Baird DT. Domestic ruminants as models for the elucidation of the mechanisms controlling ovarian follicle development in humans. *Reprod Suppl* 2003; 61:429-43.

Caplan AI. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. *J Pathol* 2009;217(2):318-24. <https://doi.org/10.1002/path.2469>.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007;25(11):2739-49. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>.

Chang LB, Peng SY, Chou CJ, Chen YJ, Shiu JS, Tu PA, Gao SX, Chen YC, Lin TK, Wu SC. Therapeutic potential of amniotic fluid stem cells to treat bilateral ovarian dystrophy in dairy cows in a subtropical region. *Reprod Domest Anim* 2018;53(4):1024. <https://doi.org/10.1111/rda.13123>.

- Chastant-Maillard S, Quinton H, Lauffenburger J, Cordonnier-Lefort N, Richard C, Marchal J, Mormede P, Renard JP. Consequences of transvaginal follicular puncture on well-being in cows. *Reproduction* 2003;125(4):555-63. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250555>.
- Cox E & Takov V. Embryology, Ovarian Follicle Development. 2021 Aug 11. In:StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 30335333.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4):315-7. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>.
- Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouny SA, Eldomiaty MA. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: Possible direct and indirect effects. *Tissue Cell* 2016;48(4):370-82. <https://doi.org/10.1016/J.tice.2016.05.001>.
- Eppig JJ. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*. 2001;122(6):829-38. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220829>.
- Esfandyari S, Chugh RM, Park HS, Hobeika E, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal Stem Cells as a Bio Organ for Treatment of Female Infertility. *Cells* 2020;9(10):2253. <https://doi.org/10.3390/cells9102253>.
- Fortune JE. Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biol Reprod* 1994;50(2):225-32. <https://doi.org/10.1095/biolreprod50.2.225>.
- Fortune JE. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles. *Anim Reprod Sci* 2003;78(3-4):135-63. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00088-5](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00088-5).
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4(5):267-74. PMID: 976387.
- Gilchrist RB, Ritter LJ, Armstrong DT. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Anim Reprod Sci* 2004;82-83:431-46. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2004.05.017>.

- Ginther OJ, Beg MA, Donadeu FX, Bergfelt DR. Mechanism of follicle deviation in monovular farm species. *Anim Reprod Sci* 2003;78(3-4):239-57. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00093-9](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00093-9).
- Glenn JD & Whartenby KA. Mesenchymal stem cells: Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World J Stem Cells* 2014;6(5):526-39. <https://doi.org/10.4252/wjsc. v6.i5.526>.
- Goto K, Kajihara Y, Kosaka S, Koba M, Nakanishi Y, Ogawa K. Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *J Reprod Fertil* 1988;83(2):753-8. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0830753>.
- Grady ST, Watts AE, Thompson JA, Penedo MCT, Konganti K, Hinrichs K. Effect of intra-ovarian injection of mesenchymal stem cells in aged mares. *J Assist Reprod Genet* 2019;36(3):543-556. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1371-6>.
- Gugjoo MB, Amarpal, Fazili MR, Shah RA, Sharma GT. Mesenchymal stem cell: Basic research and potential applications in cattle and buffalo. *J Cell Physiol* 2019;234(6):8618-8635. <https://doi.org/10.1002/jcp.27846>.
- Hafez B & Hafez E. *Reprodução Animal*, 7 ed. Manole. 2004. ISBN: 9788520412220.
- Hill ABT, Bressan FF, Murphy BD, Garcia JM. Applications of mesenchymal stem cell technology in bovine species. *Stem Cell Res Ther* 2019;10(1):44. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1145-9>.
- Hirshfield AN. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol* 1991; 124:43-101. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61524-7).
- Huang B, Lu J, Ding C, Zou Q, Wang W, Li H. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of premature ovarian insufficiency by targeting SMAD. *Stem Cell Res Ther*; 2018;9(1):216. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0953-7>
- Junqueira LC & Carneiro J. *Histologia básica*, 12 ed. Guanabara Koogan, 2013. ISBN: 9788527723114.
- Kidder GM & Mhawi AA. Gap junctions and ovarian folliculogenesis. *Reproduction* 2002;123(5):613-20. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230613>.
- König HE & Liebich HG. *Anatomia dos Animais Domésticos*, 6 ed. Artmed Editora.2016. ISBN: 9788582712993.

- Kruip TA, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MW, Pieterse MC. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 1994;42(4):675-84. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90384-u](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90384-u).
- Lai D, Wang F, Dong Z, Zhang Q. Skin-derived mesenchymal stem cells help restore function to ovaries in a premature ovarian failure mouse model. *PLoS One* 2014;9(5): e98749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098749>.
- Lambert RD, Bernard C, Rioux JE, Béland R, D'Amours D, Montreuil A, Endoscopy in cattle by the paralumbar route: Technique for ovarian examination and follicular aspiration. *Theriogenology* 1983; 20(2):149-161. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(83\)9021](https://doi.org/10.1016/0093-691x(83)9021).
- Lambert RD, Sirard MA, Bernard C, Béland R, Rioux JE, Leclerc P, Ménard DP, Bedoya M, *In vitro* fertilization of bovine oocytes matured in vivo and collected at laparoscopy, *Theriogenology* 1986; 25(1):117-133. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(86\)90188-3](https://doi.org/10.1016/0093-691x(86)90188-3).
- Lindroos B, Suuronen R, Miettinen S. The potential of adipose stem cells in regenerative medicine. *Stem Cell Rev Rep* 2011;7(2):269-91. <https://doi.org/10.1007/s12015-010-9193-7>.
- Liu R, Zhang X, Fan Z, Wang Y, Yao G, Wan X, Liu Z, Yang B, Yu L. Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice. *Stem Cell Res Ther* 2019;10(1):299. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1315-9>.
- Lotfy A, AboQuella NM, Wang H. Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. *Stem Cell Res Ther*. 2023 Apr 7;14(1):66. <https://doi.org/10.1186/s13287-023-03287-7>.
- Lu T, Xiong H, Wang K, Wang S, Ma Y, Guan W. Isolation and characterization of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) from cattle. *Appl Biochem Biotechnol* 2014;174(2):719-28. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1128-3>.
- Lucci CM, Silva RV, Carvalho CA, Figueiredo R, Bão N. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. *Small Rumin Res* 2001;41(1):61-69. [https://doi.org/10.1016/s0921-4488\(01\)00196-1](https://doi.org/10.1016/s0921-4488(01)00196-1).
- Makridakis M, Roubelakis MG, Vlahou A. Stem cells: insights into the secretome. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Nov;1834(11):2380-4. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2013.01.032>.

Malard PF, Peixer MAS, Grazia JG, Brunel HDSS, Feres LF, Villarroel CL, Siqueira LGB, Dode MAN, Pogue R, Viana JHM, Carvalho JL. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. *Sci Rep* 2020;10(1):8018. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64810-x>.

Malhi PS, Adams GP, Singh J. Bovine model for the study of reproductive aging in women: follicular, luteal, and endocrine characteristics. *Biol Reprod* 2005;73(1):45-53. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.038745>.

Mayer LP, Devine PJ, Dyer CA, Hoyer PB. The follicle-deplete mouse ovary produces androgen. *Biol Reprod* 2004;71(1):130-8. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.016113>.

Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, Brakta S, Hill WD, Ismail N, Al-Hendy A. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. *Reprod Sci* 2018;25(1):51-63. <https://doi.org/10.1177/1933719117699705>.

Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi SP, Dias EAR, Souza AH, Baruselli PS. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology* 2017; 90:54-58. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.002>.

Oktay K, Briggs D, Gosden RG. Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(11):3748-51. <https://doi.org/10.1210/jcem.82.11.4346>.

Pereira LAAC, Nascimento BR, Jorge EC, Segatelli TM, Coutinho LL, Viana JHM, Campos-Junior PHA. Vitrification leads to transcriptomic modifications of mice ovaries that do not affect folliculogenesis progression. *Reprod Biol* 2020;20(2):264-272. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.02.001>.

Perry G. 2016 statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. *Embryo Transfer Newsl.* 2017; 35(4):08-23.

Petyim S, Båge R, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H, Larsson B. Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2001;48(8):449-63. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2001.00375.x>.

Petyim S, Båge R, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H, Larsson B. The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in dairy heifers. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2000;47(10):627-40. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2000.00327.x>.

Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MA. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. *Theriogenology* 1988;30(4):751-62. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90310-x](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90310-x).

Pieterse MC, Vos PL, Kruip TA, Wurth YA, van Beneden TH, Willemse AH, Taverne MA. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. *Theriogenology* 1991;35(4):857-62. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90426-e](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90426-e).

Rani S, Ryan AE, Griffin MD, Ritter T. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: toward cell-free therapeutic applications. *Mol Ther.* 2015;23:812–23.

Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383, 2013. <https://doi.org/10.1083/jcb.201211138>

Ratajczak J, Wysoczynski M, Hayek F, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia.* 2006 Sep;20(9):1487-95. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404296>.

Ross M & Pawlina H. *Histologia: Texto e atlas*, 7 ed. Guanabara Koogan. 2016. ISBN: 978 1 4698 8931 3.

Rovani MT, Gasperin BG, Ferreira R, Duggavathi R, Bordignon V, Gonçalves P. Methods to study ovarian function in monovulatory species using the cow as a model. *Animal Reproduction* 2017; 14:383-391. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR832>.

Saha S, Roy P, Corbitt C, Kakar SS. Application of Stem Cell Therapy for Infertility. *Cells* 2021;10(7):1613. <https://doi.org/10.3390/cells10071613>.

Sampaio RV, Chiaratti MR, Santos DC, Bressan FF, Sangalli JR, Sá AL, Silva TV, Costa NN, Cordeiro MS, Santos SS, Ambrosio CE, Adona PR, Meirelles FV, Miranda MS, Ohashi OM. Generation of bovine (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) adipose tissue derived stem cells: isolation, characterization, and multipotentiality. *Genet Mol Res* 2015;14(1):53-62. <https://doi.org/10.4238/2015.January.15.7>.

- 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* 1998;50(1):89-100. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(98\)00116-2](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(98)00116-2).
- Scaramuzzi RJ, Baird DT, Campbell BK, Driancourt MA, Dupont J, Fortune JE, Gilchrist RB, Martin GB, McNatty KP, McNeilly AS, Monget P, Monniaux D, Viñoles C, Webb R. Regulation of folliculogenesis and the determination of ovulation rate in ruminants. *Reprod Fertil Dev* 2011; 23(3):444-67. <https://doi.org/10.1071/RD09161>.
- Seneda MM, Delchiaro SB, Zangirolamo AF, Alfieri AA, Morotti F. Folliculogenesis, Fertility and Biotechnology in Dairy Cattle. In (Ed.), New Advances in the Dairy Industry. 2021. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.101243>
- Seneda MM & Blaschi W. Ovum pick up em bovinos: considerações técnicas. Biotecnologia da reprodução em bovinos - 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada 231-237. 2004. Disponível em: [https://siraa.com.br/novo/wp-content/uploads/2018/04/1\\_anais\\_2004.pdf](https://siraa.com.br/novo/wp-content/uploads/2018/04/1_anais_2004.pdf)
- Sheikhansari G, Aghebati-Maleki L, Nouri M, Jadidi-Niaragh F, Yousefi M. Current approaches for the treatment of premature ovarian failure with stem cell therapy. *Biomed Pharmacother* 2018; 102: 254-262. <https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.03.056>.
- Sirard MA. The Ovarian Follicle of Cows as a Model for Human. *Animal Models and Hum Reprod* 2017; 127–144. <https://doi.org/10.1002/9781118881286.ch6>.
- Sisson S & Grossman JD. Anatomia dos animais domésticos. 5 ed. Interamericana. 1981. ISBN: 9788527714389.
- Smitz JE & Cortvrindt RG. The earliest stages of folliculogenesis in vitro. *Reproduction* 2002;123(2):185-202. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230185>.
- Stublings RB & Walton JS. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. *Theriogenology* 1995;43(4):705-12. PMID: 16727661.
- Sun L, Li D, Song K, Wei J, Yao S, Li Z, Su X, Ju X, Chao L, Deng X, Kong B, Li L. Exosomes derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells protect against cisplatin-induced ovarian granulosa cell stress and apoptosis in vitro. *Sci Rep*. 2017 May 31;7(1):2552. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02786-x>.

Takehara Y, Yabuuchi A, Ezoe K, Kuroda T, Yamadera R, Sano C, Murata N, Aida T, Nakama K, Aono F, Aoyama N, Kato K, Kato O. The restorative effects of adipose-derived mesenchymal stem cells on damaged ovarian function. *Lab Invest* 2013;93(2):181-93. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.167>.

Uri-Belapolsky S, Miller I, Shaish A, Levi M, Harats D, Ninio-Many L, Kamari Y, Shalgi R. Interleukin 1-alpha deficiency increases the expression of Follicle-stimulating hormone receptors in granulosa cells. *Mol Reprod Dev* 2017;84(6):460-467. <https://doi.org/10.1002/mrd.22799>.

Van den Hurk R, Zhao J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. *Theriogenology* 2005;63(6):1717-51. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2004.08.005>.

Van der Schans A, van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, Eyestone WH, de Boer HA. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 1991; 35(1), 288. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90264-e](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90264-e).

Viana JHM, Camargo LSA, Nascimento AA, Ferreira AM, Ferreira JF, Marques Junior AP. Consequences of repeated ultrasound-guided follicle aspiration of the ovaries of Gir (*Bos indicus*) cows. *Reprod Fertil Dev* 2006; 18:257-257. <https://doi.org/10.1071/RDv18n2Ab299>

Viana JHM, Nascimento AA, Pinheiro NL, Ferreira AM, Camargo LSA, Sá WF, Marques Júnior AP. Characterization of tissue damages after ovum pick-up in bovine. *Pesq Vet Br* 2003; 23:119-124. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2003000300004>.

Viana JHM, Figueiredo ACS, Siqueira LGB. Brazilian embryo industry in context: Pitfalls, lessons, and expectations for the future. *Anim Reprod* 2017; 14(3):476-481. <http://dx.doi.org/10.21451/1984-3143-AR989>.

Viana JHM. 2017 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals: Is it a turning point? In 2017 more in vitro-produced than in vivo-derived embryos were transferred worldwide. *Embryo Transfer News*. 2018; 36(4):08-25.

Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, Cai H, Di Vizio D, Driedonks TAP, Erdbrügger U, Falcon-Perez JM, Fu QL, Hill AF, Lenassi M, Lim SK, Mahoney MG, Mohanty S, Möller A, Nieuwland R, Ochiya T, Sahoo S, Torrecilhas AC, Zheng L, Zijlstra A, Abuelreich S, Bagabas R, Bergese P, Bridges EM, Brucale M, Burger D, Carney RP, Cocucci E, Crescitelli R, Hanser E, Harris AL, Haughey NJ, Hendrix A, Ivanov AR, Jovanovic-Talisman T, Kruh-Garcia NA, Ku'ulei-Lyn Faustino V, Kyburz D, Lässer C, Lennon KM, Lötvall J, Maddox AL,

Martens-Uzunova ES, Mizenko RR, Newman LA, Ridolfi A, Rohde E, Rojalin T, Rowland A, Saftics A, Sandau US, Saugstad JA, Shekari F, Swift S, Ter-Ovanesyan D, Tosar JP, Useckaite Z, Valle F, Varga Z, van der Pol E, van Herwijnen MJC, Wauben MHM, Wehman AM, Williams S, Zendrini A, Zimmerman AJ; MISEV Consortium; Théry C, Witwer KW. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* 2024;13(2):e12404. <https://doi.org/10.1002/jev2.12404>. Erratum in: *J Extracell Vesicles*. 2024;13(5):e12451. <https://doi.org/10.1002/jev2.12451>.

Yoon SY, Yoon JA, Park M, Shin EY, Jung S, Lee JE, Eum JH, Song H, Lee DR, Lee WS, Lyu SW. Recovery of ovarian function by human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in cisplatin-induced premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther* 2020;11(1):255. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01769-6>.

Zhao YX, Chen SR, Su PP, Huang FH, Shi YC, Shi QY, Lin S. Using Mesenchymal Stem Cells to Treat Female Infertility: An Update on Female Reproductive Diseases. *Stem Cells Int* 2019;2019:9071720. <https://doi.org/10.1155/2019/9071720>.

## **CAPÍTULO 2**

### **RELATO DE CASO: ACHADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS EM VACAS DA RAÇA GIR SUBMETIDAS A ASPIRAÇÃO FOLICULAR ORIENTADA POR ULTRASSONOGRAFIA TRANSVAGINAL**

## RESUMO

A aspiração folicular transvaginal (OPU) é amplamente utilizada em programas de produção *in vitro* de embriões (PIVE) com fêmeas bovinas de alto valor genético. No entanto, a OPU pode provocar alterações morfológicas indesejáveis nos ovários das doadoras, especialmente quando realizada de forma repetitiva. Este capítulo apresenta um relato de caso envolvendo vacas da raça Gir submetidas a sessões repetidas de OPU, com ênfase nas consequências clínicas e histopatológicas observadas. Foram realizadas avaliações ultrassonográficas dos ovários e útero, dosagens plasmáticas de hormônio anti-Mülleriano (AMH) e análises macro e microscópicas dos ovários de 12 vacas abatidas de um mesmo rebanho. Os resultados demonstraram que o aumento no número de sessões de OPU esteve associado à redução na recuperação de oócitos ( $R^2=-76,7$ ;  $P<0,0001$ ), viabilidade ovocitária ( $R^2=-46,1$ ;  $P<0,0001$ ) e produção embrionária ( $R^2=-22,8$ ;  $P=0,0066$ ). Do ponto de vista clínico-patológico, 91,7% (11/12) das vacas apresentaram doença cística ovariana, e 83,3% (10/12) apresentavam mucometra. Aderências entre ovários e estruturas adjacentes foram observadas em 16,7% (4/24) dos ovários. Houve correlação significativa entre o peso ovariano e o diâmetro do maior folículo ( $R=0,7857$ ,  $P<0,0001$ ), bem como, com o número de folículos >8 mm ( $R=0,6451$ ,  $P=0,0007$ ). Não houve correlação significativa entre o peso ovariano e o total de folículos antrais ( $R=-0,2553$ ,  $P=0,2285$ ). Histologicamente, todos os ovários exibiram graus variáveis de enrijecimento e deposição de colágeno, sendo esse achado em 82% (9/11) das doadoras. Focos hemorrágicos foram identificados em 91% (10/11) dos casos. Os achados indicam que a realização frequente de OPU pode comprometer progressivamente a função reprodutiva em vacas Gir, destacando a importância de estratégias de manejo que visem preservar a saúde reprodutiva e a longevidade produtiva dessas doadoras.

**Palavras-chave:** aspiração folicular transvaginal, produção *in vitro* de embriões, avaliação clínica, avaliação macroscópica, histopatologia, lesões ovarianas, bovinos.

## **ABSTRACT**

Ovum Pick-Up (OPU) is widely used in *in vitro* embryo production (IVEP) programs with bovine females of high genetic value. However, OPU can cause undesirable morphofunctional changes in donor ovaries, especially when performed repeatedly. This chapter presents a case report involving Gir cows submitted to repeated OPU sessions, with emphasis on the clinical and histopathological consequences observed. Ultrasound evaluations of the ovaries and uterus, plasma dosages of anti-Müllerian hormone (AMH) and macro and microscopic analyses of the ovaries of 12 cows slaughtered from the same herd were carried out. The results showed that an increase in the number of OPU sessions was associated with a reduction in oocyte recovery ( $R^2=-76.7$ ;  $P<0.0001$ ), oocyte viability ( $R^2=-46.1$ ;  $P<0.0001$ ) and embryo production ( $R^2=-22.8$ ;  $P=0.0066$ ). From a clinical-pathological point of view, 91.7% (11/12) of the cows had cystic ovarian disease and 83.3% (10/12) had mucometra. Adhesions between the ovaries and adjacent structures were observed in 16.7% (4/24) of the ovaries. There was a significant correlation between ovarian weight and the diameter of the largest follicle ( $R=0.7857$ ,  $P<0.0001$ ), as well as with the number of follicles  $>8$  mm ( $R=0.6451$ ,  $P=0.0007$ ). There was no significant correlation between ovarian weight and total antral follicles ( $R=-0.2553$ ,  $P=0.2285$ ). Histologically, all the ovaries showed varying degrees of stiffening and collagen deposition, with this finding being observed in 82% (9/11) of the donors. Hemorrhagic foci were identified in 91% (10/11) of the cases. The findings indicate that frequent OPU can progressively compromise reproductive function in Gir cows, highlighting the importance of management strategies aimed at preserving the reproductive health and productive longevity of these donors.

**Key words:** transvaginal follicular aspiration, *in vitro* embryo production, clinical evaluation, macroscopic evaluation, histopathology, ovarian lesions, cattle.

## INTRODUÇÃO

A aspiração folicular orientada por ultrassonografia transvaginal, também conhecida como *Ovum Pick-Up* (OPU), consolidou-se como a técnica de escolha para a recuperação de complexos *cumulus*-oócito (COCs) de doadoras vivas destinadas à fertilização *in vitro* (Galli et al., 2001). O desenvolvimento e a consolidação dessa técnica permitiram a coleta de oócitos de fêmeas bovinas de forma segura, rápida e eficiente, impulsionando significativamente a produção *in vitro* de embriões (PIVE) como ferramenta estratégica para multiplicação e melhoramento genético (Pieterse et al., 1988; Kruip et al., 1994).

A OPU é considerada uma técnica minimamente invasiva, que possibilita coletas seriadas em fêmeas com diferentes perfis reprodutivos, sem comprometer visivelmente a fertilidade e sem a necessidade de protocolos hormonais prévios (Pieterse et al., 1991). Além disso, não interrompe o ciclo estral da doadora, apresenta custo relativamente baixo por sessão e permite a fertilização de um número elevado de oócitos com uma única palheta de sêmen (Pontes et al., 2010). A técnica também viabiliza o uso de sêmen de diferentes touros geneticamente superiores, inclusive sêmen sexado, otimizando os programas de melhoramento genético (Choudhary et al., 2016). A coleta direta de oócitos dos ovários por meio da OPU revolucionou as biotecnologias reprodutivas em bovinos, permitindo o uso prolongado de fêmeas de alto valor genético em programas de PIVE (Bols & Stout, 2018).

No entanto, apesar de ser considerada minimamente invasiva, a OPU pode provocar alterações morfológicas indesejáveis nos ovários das doadoras, especialmente quando realizada de forma repetitiva (Viana et al., 2003). Há relatos de lesões ovarianas associadas ao número de sessões e punções, incluindo espessamento da túnica albugínea, aderências, fibrose do estroma ovariano, desorganização tecidual, hemorragias e infiltrados inflamatórios (Van der Schans et al., 1991; Petyim et al., 2000; Petyim et al., 2001; Viana et al., 2003; Viana et al., 2006). Além disso, alterações endocrinológicas também têm sido observadas com a realização contínua da técnica, acompanhadas de redução progressiva no número de folículos disponíveis e na taxa de recuperação de oócitos (Stublings & Walton, 1995; Petyim et al., 2000; Petyim et al., 2001; Monteiro et al., 2017).

Estudos prévios confirmam a eficácia da OPU associada à PIVE na produção de embriões viáveis, reforçando seu papel nos programas intensivos de melhoramento

genético (Pontes et al., 2010). Contudo, investigações como a de Viana et al. (2003) evidenciaram que múltiplas sessões de aspiração podem causar alterações estruturais nos ovários. Relatos de complicações clínicas graves também foram documentados, incluindo casos que evoluíram para quadros clínicos desfavoráveis ou mesmo à morte do animal (Dória et al., 2008). Apesar disso, ainda são escassos os estudos que correlacionam achados clínicos e histopatológicos nesse contexto, especialmente no gado zebuíno. Diante desse cenário, este capítulo tem como objetivo relatar casos clínicos de vacas da raça Gir submetidas a sessões repetidas de OPU, com ênfase nas manifestações clínicas e nas alterações histopatológicas observadas.

## MATERIAL E MÉTODOS

As doadoras utilizadas neste estudo eram provenientes de um único rebanho da raça Gir (*Bos taurus indicus*), pertencente à Fazenda do Basa, localizada no município de Leopoldina, Minas Gerais (21°31'55"S, 42°38'35"W; 225 m de altitude). Os animais foram mantidos em sistema de pastejo rotacionado com grama-estrela (*Cynodon nemfuensis*) cv. Africana, com acesso *ad libitum* a água e sal mineral, além de suplementação com ração contendo 22% de proteína bruta, silagem de milho e feno.

As fêmeas apresentavam histórico de múltiplas sessões de OPU para PIVE. Tanto as OPU quanto a PIVE foram conduzidas por técnicos de duas empresas especializadas, seguindo protocolos e frequência operacionais padrão dos respectivos laboratórios comerciais. Os procedimentos de OPU e as avaliações ginecológicas de rotina foram realizados no contexto dos objetivos reprodutivos da própria fazenda.

Os animais foram descartados para abate em virtude de problemas reprodutivos e baixo desempenho nos programas de OPU-PIVE. O proprietário assinou termo de consentimento autorizando a realização das análises histopatológicas e o uso dos dados reprodutivos e produtivos para fins científicos.

Uma semana antes do abate, as doadoras foram submetidas à avaliação ultrassonográfica transretal com equipamento portátil (MyLab 30 Vet Gold, Esaote, Gênova, Itália), acoplado a transdutor linear de 7,5 MHz, com o objetivo de caracterizar possíveis alterações uterinas e ovarianas. Na mesma ocasião, foi realizada a coleta de sangue para determinação da concentração plasmática do hormônio antimülleriano (AMH).

Imediatamente após o abate, o trato genital foi separado das vísceras e os ovários foram submetidos à avaliação macroscópica. Cada ovário foi pesado em balança analítica, medido com auxílio de paquímetro, inspecionado quanto à presença de aderências, e avaliado subjetivamente quanto à presença de fibrose, utilizando-se escala de pontuação de 0 (-) a 3 (+++). Posteriormente, os ovários foram fragmentados e fixados em solução de paraformaldeído a 4% para processamento histológico.

As lâminas histológicas foram confeccionadas conforme descrito a seguir. Os fragmentos foram inicialmente imersos em solução tampão de Sorensen (pH 7,3), desidratados em série crescente de soluções alcoólicas (70%, 80%, 90% e 100%) e xanol, emblocados em paraplast e seccionados em micrótomo em cortes seriados de 5 µm. As lâminas foram coradas com Gomori para posterior análise por microscopia óptica. Os parâmetros avaliados foram: presença de focos hemorrágicos, edema, tecido luteal e deposição de colágeno.

A dosagem de AMH foi realizada conforme metodologia empregada seguiu os procedimentos estabelecidos pelo laboratório responsável pela análise, conforme seus protocolos técnicos vigentes. As amostras foram analisadas em duplicata por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kits comerciais (AL114, AnshLabs, Webster, TX, EUA), em laboratório privado (Leac, São Paulo, SP, Brasil). O coeficiente de variação intra-ensaio foi de 2,4%.

Além das avaliações anatômicas e histológicas, os dados reprodutivos anteriores ao abate também foram analisados. Para cada doadora, foram avaliados: número de sessões de OPU realizadas, número total de oócitos recuperados, número de oócitos viáveis e número de embriões produzidos, com o objetivo de investigar possíveis associações com as alterações morfológicas observadas.

Os principais achados clínicos e histopatológicos foram apresentados utilizando-se estatística descritiva (percentuais, escores subjetivos ou média ± EPM). Associações entre variáveis foram analisadas utilizando-se o método das correlações de Pearson ou análise de regressão, e apresentadas como coeficientes de correlação (R) ou determinação ( $R^2$ ). Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos.

## **RESULTADOS**

### **1. Avaliação de lesões decorrentes da OPU em doadoras problema**

#### **1.1. Análise retrospectiva dos resultados de OPU-PIVE**

Os dados do histórico de resultados da OPU-PIVE das doadoras utilizadas no estudo estão compilados na Tabela 1. As doadoras analisadas neste estudo apresentaram idade média de 10,4 anos e foram submetidas em média à 16,1 sessões de OPU. O desempenho médio dos animais foi de 14,2 oócitos recuperados, 9,4 oócitos viáveis e 3,1 embriões produzidos por sessão de OPU.

A Figura 1 mostra a relação entre o número de aspirações e a quantidade de oócitos recuperados, oócitos viáveis e embriões produzidos. Observou-se que quanto maior o número de sessões de OPU realizadas menor foi o número de oócitos recuperados ( $R^2=-76,7$ ;  $P<0,0001$ ), de oócitos viáveis ( $R^2=-46,1$ ;  $P<0,0001$ ) e de embriões produzidos ( $R^2=-22,8$ ;  $P=0,0066$ ) das doadoras. O  $R^2$  para oócitos recuperados apresentou maior valor, para oócitos viáveis um valor intermediário, e para a quantidade de embriões produzidos valor mais baixo, uma vez que as duas primeiras variáveis estão diretamente associadas à condição do ovário. Já o último, o sucesso da produção de embriões *in vitro* depende de diversos outros fatores, como sêmen e sistema de cultivo utilizados.

Tabela 1. Histórico dos resultados da OPU-PIVE nas doadoras Gir utilizadas no estudo.

Doadora	Idade <sup>1</sup>	OPU <sup>2</sup>	Oócitos Recuperados		Oócitos Viáveis		Embriões	
			Total	Média±EPM	Total	Média±EPM	Total	Média±EPM
A	8,7	8	96	12,0±2,0	59	7,4±1,2	13	1,6±0,5
B	9,4	14	147	10,5±1,2	93	6,6±0,9	5	0,4±0,2
C	13,9	9	132	14,7±3,1	79	8,8±1,9	19	2,1±0,6
D	10,1	16	134	8,4±1,1	87	5,4±0,8	25	1,6±0,4
E	9,0	15	283	18,9±1,9	245	16,3±1,6	90	6,0±0,8
F	9,1	9	152	16,9±2,4	97	10,8±2,1	21	2,3±0,8
G	11,9	28	621	22,2±2,7	399	14,3±1,7	115	4,1±0,6
H	11,9	24	640	26,7±3,3	421	17,5±2,1	168	7,0±1,2
I	9,5	19	456	24,0±1,9	294	15,5±1,7	88	4,6±0,6
J	9,7	6	23	4,6±1,4	15	3,0±0,9	10	2,0±1,0
K	9,8	10	108	10,8±1,8	78	7,8±1,6	38	3,8±1,3
L	10,0	12	90	7,5±1,1	56	4,7±0,8	18	1,5±0,3
M	11,2	18	115	6,4±0,8	63	3,5±0,5	14	0,8±0,2
N	10,0	22	247	11,2±1,4	172	7,8±0,9	79	3,6±0,5
O	11,8	31	581	18,7±1,9	372	12,0±1,0	176	5,7±0,6
Média			10,4±0,4	16,1±2,0		14,2±1,7		9,4±1,2
								3,1±0,5

<sup>1</sup> Em anos

<sup>2</sup> Total de aspirações registradas

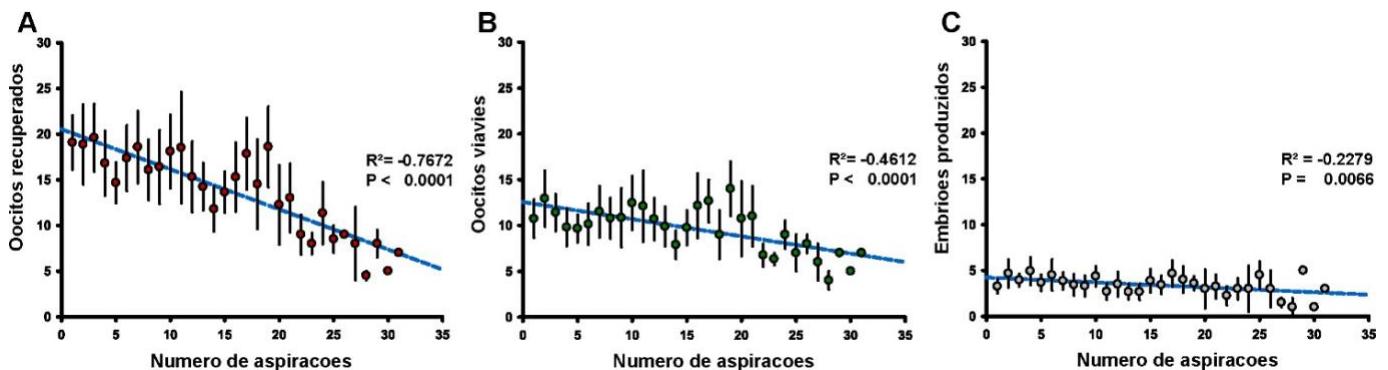


Figura 1. Relação entre número de aspirações e os resultados da OPU e PIVE em doadoras da raça Gir. (A) Associação entre número de aspirações e total de oócitos recuperados; (B) Associação entre número de aspirações e número de oócitos viáveis; e (C) Associação entre número de aspirações e total de embriões produzidos *in vitro*.

## 1.2. Avaliação Ginecológica

Dos animais avaliados, 91.7% (11/12) apresentavam doença ovariana cística (DOC), caracterizada pela presença de múltiplos folículos com diâmetro superior ao associado à ovulação na raça Gir (12 mm) (Viana et al., 2000). Coerentemente, 83.3% (10/12) também apresentavam mucometra, caracterizada pelo acúmulo de muco no útero (Tabela 2). A concentração de AMH apresentou uma correlação baixa e não significativa com a população de folículos antrais (Figura 2). A média da concentração de AMH das doadoras do estudo (391,93 ng/mL) está abaixo do preconizado para seleção de doadoras de oócitos na raça Gir (622.5 a 761.4 ng/mL) (Feres et al., 2024).

Tabela 2. Resultado do exame ginecológico e da dosagem de AMH nas doadoras Gir utilizadas no estudo.

Doadora	CFA <sup>1</sup>	AMH <sup>2</sup>	Maior Fol. <sup>3</sup>	FD <sup>4</sup>	Mucometra
A	13	729,12	20	4	Presente
B	24	458,46	18	3	Presente
D	12	193,11	20	4	Ausente
E	18	533,43	38	4	Presente
F	18	750,57	20	3	Presente
G	10	283,50	23	3	Presente
H	11	300,60	18	5	Presente
I	17	152,12	27	2	Presente
J	10	84,12	10	1	Ausente
K	9	455,63	25	5	Presente
L	8	221,90	20	3	Presente
O	21	540,63	25	3	Presente
Média	14.3±5.2	391,93±63,6	22.0±6.7	3.3±1.1	

<sup>1</sup> Total de folículos antrais (> 2mm)

<sup>2</sup> Em ng/mL

<sup>3</sup> Em mm. Folículos acima de 14 mm caracterizam doença ovariana cística

<sup>4</sup> Número de folículos acima de 8 mm

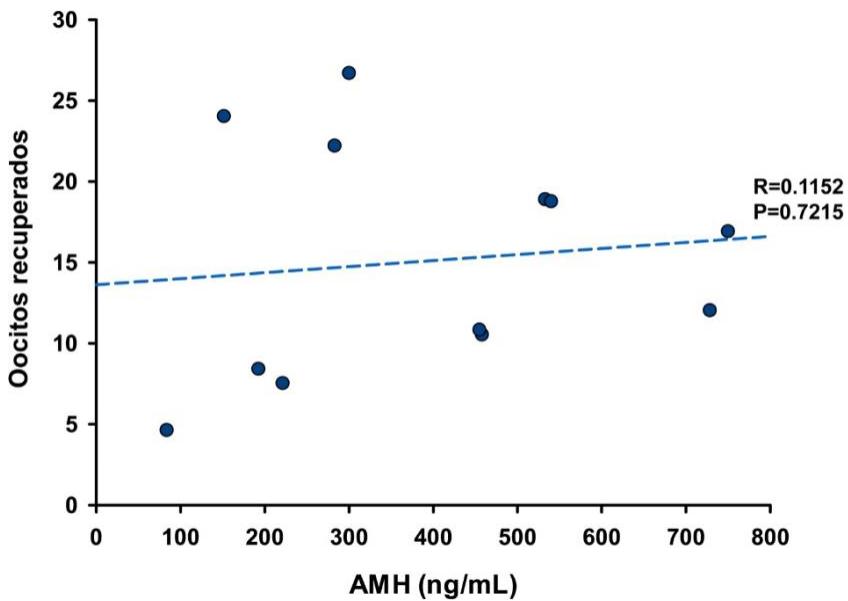


Figura 2. Relação entre número de oócitos recuperados por OPU e concentração circulante de AMH em doadoras Gir.

### 1.3. Avaliação macroscópica dos ovários

Aderências entre o ovário e órgãos adjacentes foram observados em 16,7% (4/24) dos ovários, mas em 25,0% (3/12) dos animais (Tabela 3). Todos os ovários apresentavam algum grau de enrijecimento, sugestivo de fibrose, como demonstrado na Figura 3. A presença de cistos foliculares foi o principal determinante do peso dos ovários. O diâmetro do maior folículo e o número de folículos > 8mm presentes, mas não o total de folículos antrais, apresentaram correlação significativa com o peso do ovário ( $R=0,7857$ ,  $P<0,0001$ ;  $R=0,6451$ ,  $P=0,0007$ ; e  $R=-0,2553$ ,  $P=0,2285$ , respectivamente).

Tabela 3. Avaliação macroscópica post-mortem de ovários de vacas da raça Gir utilizadas como doadoras de óócitos e subsequentemente destinadas ao descarte por baixa produção de embriões.

Doadora	OD					OE						
	C <sup>1</sup>	L <sup>2</sup>	A <sup>3</sup>	Peso <sup>4</sup>	Fibrose	Aderência	C	L	A	Peso	Fibrose	Aderência
A <sup>5</sup>				13.70	++	0				3.41	+	0
B	4.0	3.0	2.4	14.83	++	0	3.0	1.6	1.9	5.24	++	0
C	2.8	2.2	1.9	6.24	++	1	2.9	1.8	1.7	4.84	+	1
D	5.0	4.1	4.2	40.15	++	0	3.1	2.4	2.1	7.78	++	0
E	3.8	2.9	2.6	17.57	+++	0	3.6	1.6	1.4	4.40	+++	0
F	4.0	3.6	3.6	26.76	++	1	2.4	1.7	1.8	4.38	++	0
G	3.0	2.5	2.1	9.69	++	0	2.8	2.5	2.3	9.88	++	0
H	4.1	2.6	2.8	12.85	+++	0	3.2	2.1	1.7	6.78	+++	0
I	3.4	2.2	2.0	6.00	+	0	2.1	1.6	1.7	3.08	++	0
J	4.2	3.4	3.2	26.80	++	1	3.7	2.2	2.0	6.01	+++	0
K	2.9	2.5	2.4	11.12	++	0	2.6	2.1	1.1	6.38	++	0
L	3.8	3.2	2.9	18.08	++	0	2.4	1.9	1.8	4.80	+++	0

<sup>1</sup>Comprimento (em cm)

<sup>2</sup> Largura (em cm)

<sup>3</sup> Altura (em cm)

<sup>4</sup> Em g

<sup>5</sup>Dado perdido

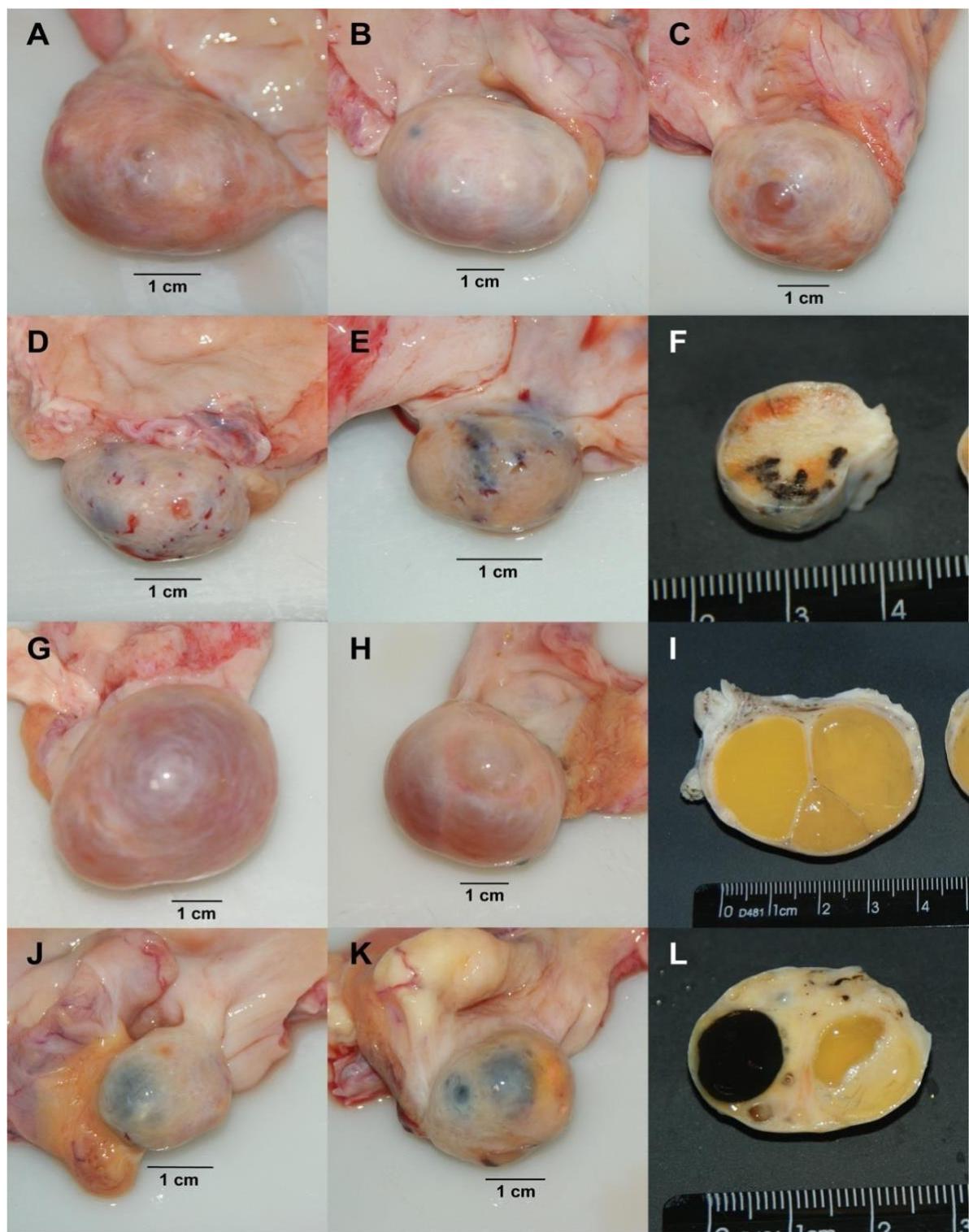


Figura 3. Alterações macroscópicas observadas em ovários de vacas da raça Gir submetidas à repetidas sessões de OPU. A-C: espessamento da túnica albugínea; D-F: soluções de continuidade na túnica albugínea; G-I: doença ovariana cística; J-L: hemorragia intrafolicular. Obs.: F, I, L correspondem a ovários pós fixação em paraformaldeído 4%.

#### **1.4. Avaliação histopatológica dos ovários**

Tabela 4. Caracterização microscópica de lesões observadas em doadoras da raça Gir submetidas a sessões repetidas de OPU.

Parâmetro	Doadora										
	A	B	D	E	F	G	H	I	J	L	O
Focos Hemorrágicos	++	++	+	++	+++	-	+	++	+	++	+
Edema	-	+	+	+	++	+	++	++	-	++	+
Tecido Luteal	+++	-	+	-	++	+	-	+	-	+	+
Deposição de Colágeno	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++

Todas as doadoras apresentaram níveis variando de moderado (++) à intenso (+++) de deposição de colágeno. Em 82% (9/11) das doadoras foi observado nível intenso de deposição de colágeno. Focos hemorrágicos estiveram presentes em 91% (10/11) das doadoras, resultados demonstrados na Tabela 4.

Durante a avaliação microscópica dos ovários, alterações como hemorragia difusa no parênquima ovariano e intrafolicular, lesões no trajeto da agulha e parede folicular remanescente da aspiração também foram observados (Figura 4).

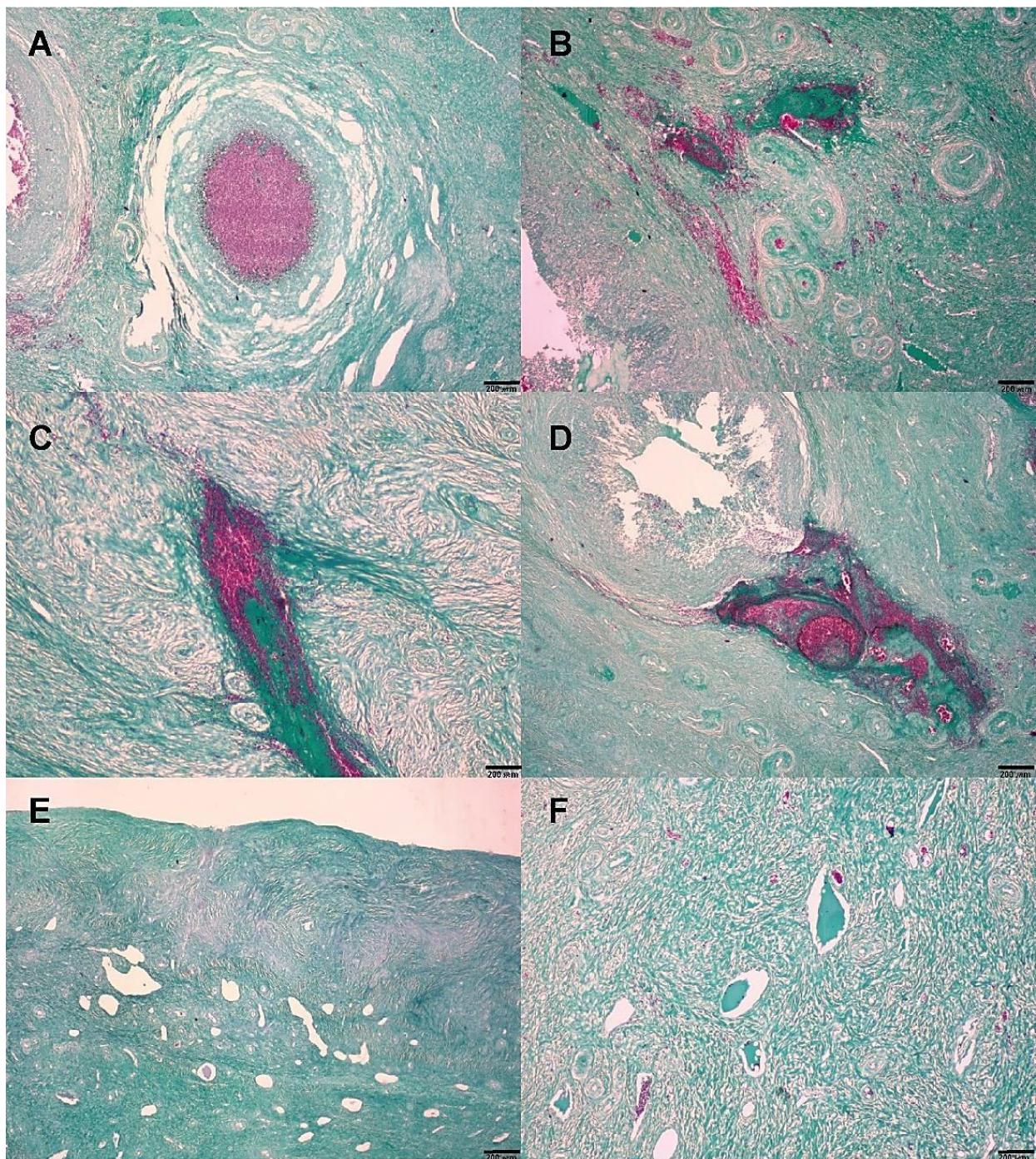


Figura 4. Alterações histopatológicas observadas em ovários de vacas da raça Gir submetidas a repetidas sessões de OPU. A: Hemorragia intrafolicular; B: Hemorragia difusa no parênquima ovariano; C: Lesão no trajeto da agulha; D: Parede folicular remanescente da aspiração; E: Acúmulo de colágeno no tecido ovariano; F: Edema. (Gomori, Obj. 40X).

## DISCUSSÃO

O objetivo do presente estudo foi descrever e caracterizar os principais achados macroscópicos e histológicos em ovários de doadoras submetidas à OPU de maneira frequente. O histórico de aspirações das doadoras utilizadas neste estudo demonstra que o número de sessões de OPU em doadoras Gir tem um impacto negativo sobre a recuperação e viabilidade de oócitos, e PIVE. Observou-se uma relação inversamente proporcional entre o número de sessões de OPU e os parâmetros analisados (oócitos recuperados, oócitos viáveis e produção de embriões), sugerindo que a quantidade de procedimentos pode comprometer a eficiência das doadoras ao longo do tempo. Achados descritos em estudos anteriores sugerem que a exposição repetitiva e prolongada à OPU pode comprometer a função endócrina e a dinâmica folicular, devido às alterações funcionais e estruturais nos ovários, o que pode justificar os resultados observados neste estudo (Carlin et al., 1999; Petyim et al., 2001; Viana et al., 2003; Oliveira et al., 2018).

Além da queda na produção de oócitos e embriões, a avaliação ginecológica revelou que a maioria das doadoras apresentava DOC e mucometra. A DOC é caracterizada pela presença de uma ou múltiplas estruturas semelhantes a folículos, de grande diâmetro ( $>12$  mm), presentes em um ou ambos os ovários, que persistem por mais de 10 dias, na ausência de corpo lúteo. Os cistos mantêm crescimento e esteroidogênese, interferindo na ciclicidade ovariana normal e podendo causar anormalidades físicas e comportamentais como virilismo, ninfomania e anestro (Casida et al., 1944; Garverick, 1997; Peter, 2004; Vanholder et al., 2006; Jeengar et al., 2014).

A DOC foi identificada em 91.7% dos animais avaliados, enquanto 83.3% também apresentavam mucometra. A associação entre DOC e mucometra já foi descrita anteriormente por diversos autores (Hatipoglu et al., 2002; Purohit, 2008; Dutt et al., 2019; Suresh et al., 2020; Viana et al., 2021). A persistência dos cistos ovarianos de maneira prolongada causa hipertrofia das glândulas endometriais e, consequentemente, patologias uterinas como a mucometra (Purohit et al., 2008). A associação entre as duas patologias observadas nesse estudo sugere um possível efeito indireto das aspirações repetidas sobre a regulação hormonal, uma vez que a formação de cistos ovarianos geralmente está associada a distúrbios no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, que tem etiologia multifatorial (Peter, 2004; Vanholder et

al., 2006). Em bovinos, a presença de DOC leva à subfertilidade, aumenta o período entre concepções, anovulação persistente e infertilidade, sendo um fator crítico para a redução da longevidade reprodutiva de doadoras utilizadas em programas de PIVE (Garverick, 1997; Silvia et al., 2002; Isobe, 2007).

A concentração circulante de AMH é positivamente associada com a população de folículos antrais no gado zebuíno (Batista et al., 2014; Baldrihi et al., 2014). Nas doadoras avaliadas neste estudo, a concentração média de AMH plasmático foi de 391,9 ng/mL, valor esse inferior ao descrito como ponto de corte (622,5 a 761,4 ng/mL) para seleção de doadoras da raça Gir em programas OPU-PIVE (Feres et al., 2024). Embora o AMH seja um biomarcador de reserva ovariana importante como preditor de capacidade reprodutiva, neste estudo, a correlação foi baixa e não significativa ( $R=0,1152$ ;  $P=0,7215$ ) entre o AMH e a população de folículos antrais. Deve-se levar em consideração que diversos fatores têm impacto sobre a concentração do hormônio, como idade, categoria, variações individuais, genética e ambiente (Mossa et al., 2017). As alterações encontradas nos ovários dos animais deste estudo podem ter influenciado o resultado dessa avaliação.

Ademais, o AMH não deve ser usado como único critério para seleção ou exclusão de animais de programas de reprodução (Feres et al., 2024). Em um estudo de Harris et al., (2023), biomarcadores sugestivos de reserva ovariana diminuída não foram associados à redução futura da capacidade reprodutiva em mulheres.

A análise macroscópica dos ovários no *post-mortem* demonstrou que todos os animais do estudo ( $n=12$ ) possuíam algum grau de alteração estrutural como fibrose ou espessamento da túnica albugínea, 25% animais também apresentaram aderências dos ovários aos tecidos adjacentes. Esse resultado indica que a OPU provoca danos estruturais aos ovários. Além disso, foi observada uma correlação significativa entre o peso ovariano e o número de folículos  $>8$  mm ( $R=0,6451$ ;  $P=0,0007$ ), indicando que a presença de cistos foi um fator determinante para o aumento do volume ovariano. A presença de hemorragia intrafolicular e lesões no trajeto da agulha sugerem que o processo repetitivo de aspiração causa micro traumas recorrentes no tecido ovariano, contribuindo para o quadro de inflamação crônica e deposição excessiva de colágeno.

No exame histopatológico, a deposição de colágeno foi intensa (+++) em 82% das doadoras, indicando grau de fibrose avançado. A fibrose ovariana compromete a dinâmica folicular e a capacidade funcional do ovário (Zhou et al., 2017; Gu et al.,

2024), o que pode explicar a redução progressiva na recuperação de oócitos pela técnica de OPU observada neste estudo, fato esse, já documentado previamente por outros autores (Merton et al., 2003; Monteiro et al., 2017). A presença de focos hemorrágicos em 91% das doadoras reforça a hipótese de que o trauma mecânico repetitivo causado pela agulha de aspiração é um fator determinante para as alterações degenerativas nos ovários.

Diante dos achados, fica evidenciado que a repetição excessiva da OPU pode comprometer a viabilidade reprodutiva das doadoras, tanto pela redução na eficiência da recuperação de oócitos quanto pelas alterações estruturais observadas nos ovários. Algumas estratégias como maiores intervalos entre as sessões, operadores experientes e uso de agulhas descartáveis de calibre mais fino, podem ser adotadas para minimizar esses efeitos adversos. O monitoramento frequente do desempenho das doadoras e da presença de alterações ovarianas pode auxiliar na definição do número ideal de aspirações ao longo da vida reprodutiva do animal. O uso de biomarcadores como AMH, aliado à contagem de folículos antrais (CFA) por ultrassonografia podem ser ferramentas importantes para avaliar a reserva ovariana e prever a resposta à PIVE antes da inserção da doadora em esquemas de OPU (Feres et al., 2024).

## CONCLUSÃO

Vacas Gir submetidas a sessões de OPU recorrentes podem apresentar comprometimento reprodutivo progressivo, com redução na recuperação de oócitos e produção de embriões, e desenvolvimento de alterações ginecológicas e histopatológicas graves. Medidas de manejo reprodutivo devem ser adotadas para otimizar a longevidade reprodutiva dessas doadoras e minimizar os impactos adversos associados ao procedimento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldighi J, Sá Filho MF, Batista EO, Lopes RN, Visintin JA, Baruselli PS, Assumpção ME. Anti-Mullerian hormone concentration and antral ovarian follicle population in Murrah heifers compared to Holstein and Gyr kept under the same management. Reprod Domest Anim 2014; 49(6):1015-20. <https://doi.org/10.1111/rda.12430>.

Batista EO, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MD, Sá Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes RN, Rennó FP, Baruselli PS. Plasma antimüllerian hormone as a predictor of ovarian antral follicular population in Bos indicus (Nelore) and Bos taurus (Holstein) heifers. *Reprod Domest Anim* 2014; 49(3):448–452. <https://doi.org/10.1111/rda.12304>.

Bols SPEJ, Stout TAE. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval (OPU: Ovum pick-up) in cows and mares. In: NIEMANN, H.; WRENZYCKI, C. (Ed.). Animal Biotechnology 1: Reproductive Biotechnologies. 1. ed. Cham, Switzerland: Springer International Publishing, 2018. p. 209–233. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-319-92327-7_10).

Carlin SK, Garst AS, Tarraf CG, Bailey TL, McGilliard ML, Gibbons JR, Ahmadzadeh A, Gwazdauskas FC. Effects of ultrasound-guided transvaginal follicular aspiration on oocyte recovery and hormonal profiles before and after GnRH treatment. *Theriogenology* 1999; 51(8):1489–1503. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(99\)00092-8](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(99)00092-8).

Casida LE, McShan WH, Meyer RK. 1944. Effects of an unfractionated pituitary extract upon cystic ovaries and nymphomania in cows. *J Anim Sci* 1944; 3:273-282. <https://doi.org/10.2527/JAS1944.33273X>.

Choudhary KK, Kavya KM, Jerome A, Sharma RK. Advances in Reproductive Biotechnologies. *Vet World* 2016; 9(4):388. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.388-395>.

Dória RGS, Canola PA, Cardilli DJ, Toniollo GH, Leite FG, Esper CR, Canola JC, Complicações clínicas em vacas Nelore doadoras de óocitos decorrentes da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassom. *Br Anim Sci* 2008; 9(3):806–810. <https://doi.org/10.5216/cab.v9i3.4943>.

Dutt R, Singh G, Gahalot SC, Patil SS, Sharma K, Dhaka AP, Yadav V. Mucometra associated with Cystic Ovarian Disease and Uterine Unicornis in Sahiwal cow. *Explor Anim Med Res* 2019; 8(2):82-83.

Feres, LFR, Siqueira LGB, Palhao MP, Dos Santos LL, Pfeifer LFM, de Carvalho Fernandes CA, Viana JHM. Selecting oocyte donors based on anti-Müllerian hormone (AMH) concentrations: a critical analysis of using cutoff values as exclusion criterion for an in vitro embryo production program in Gir cattle. *Anim Reprod Sci* 2024; 266:107491. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2024>.

- Galli C, Crotti G, Notari C, Turini P, Duchi R, Lazzari G. Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology* 2001; 55:1341-1357. [https://doi.org/10.1016/s0093-691x\(01\)00486-1](https://doi.org/10.1016/s0093-691x(01)00486-1).
- Garverick HA. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; 80:995-1004. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(97\)76025-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(97)76025-9).
- Gu M, Wang Y, Yu Y. Ovarian fibrosis: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *J Ovarian Res* 2024; 17:139. <https://doi.org/10.1186/s13048-024-01448-7>.
- Harris BS, Jukic AM, Truong T, Nagle CT, Erkanli A, Steiner AZ. Markers of ovarian reserve as predictors of future fertility. *Fertil Steril* 2023; 119(1):99-106. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2022.10.014>.
- Hatipoglu F, Kiran MM, Ortatatlı M, Erer H, Çiftçi MK. An abattoir study of genital pathology in cows: I. Ovary and oviduct. *Revue Méd Vét* 2002; 153:29-34.
- Isobe N. Follicular cysts in dairy cows. *Anim Sci J* 2007; 78:1-6. <https://doi.org/10.1111/j.1740-0929.2006.00397.x>.
- Jeengar K, Chaudhary V, Kumar A, Raiya S, Gaur M, Purohit GN. Ovarian cysts in dairy cows: old and new concepts for definition, diagnosis and therapy. *Anim Reprod* 2014; 11(2):63-73.
- Kruip TA, Boni R, Wurth YA, Roelofsen MW, Pieterse MC. Potential use of ovum pick-up for embryo production and breeding in cattle. *Theriogenology* 1994;42(4):675-84. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(94\)90384-u](https://doi.org/10.1016/0093-691x(94)90384-u).
- Merton JS, de Roos APW, Mullaart E, de Ruigh L, Kaal L, Vos PLAM, Dieleman SJ. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial application of embryo technologies in the cattle breeding industry. *Theriogenology* 2003; 59:651-74. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01246-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01246-3).
- Monteiro FM, Batista EOS, Vieira LM, Bayeux BM, Accorsi M, Campanholi SP, Dias EAR, Souza AH, Baruselli PS. Beef donor cows with high number of retrieved COC produce more in vitro embryos compared with cows with low number of COC after repeated ovum pick-up sessions. *Theriogenology* 2017; 90:54-58. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2016.11.002>.
- Mossa F, Jimenez-Krassel F, Scheetz D, Weber-Nielsen M, Evans ACO, Ireland JJ. Anti-Müllerian Hormone (AMH) and fertility management in agricultural species. 7. *Reproduction* 2017; 154(1):1–11. <https://doi.org/10.1530/rep-17-0104>.
- Oliveira CE, Musse G, Coelho HE, Alberto H, Nolasco RM, Barbosa CHG, Rezende LC, Carvalho TF, Lopes LO, Lopes MC. Alterações macroscópicas e

- histopatológicas ovarianas em vacas doadoras zebuínas. PUBVET 2018; 12(4):1-6. <https://doi.org/10.22256/pubvet.v12n4a71.1-6%20>.
- Peter AT. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. Reprod Domest Anim 2004;39(1):1-7. <https://doi.org/10.1046/j.0936-6768.2003.00466.x>.
- Petyim S, Båge R, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H, Larsson B. The effect of repeated follicular puncture on ovarian function in dairy heifers. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2000;47(10):627-40. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2000.00327.x>.
- Petyim S, Båge R, Forsberg M, Rodríguez-Martínez H, Larsson B. Effects of repeated follicular punctures on ovarian morphology and endocrine parameters in dairy heifers. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 2001;48(8):449-63. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0442.2001.00375.x>.
- Pieterse MC, Kappen KA, Kruip TA, Taverne MAM. Aspiration of bovine oocytes during transvaginal ultrasound scanning of the ovaries. Theriogenology 1988; 30(4):751-762. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(88\)90310-x](https://doi.org/10.1016/0093-691x(88)90310-x).
- Pieterse MC, Vos PL, Kruip TA, Wurth YA, Van Beneden TH, Willemse AH, Taverne MA. Transvaginal ultrasound guided follicular aspiration of bovine oocytes. Theriogenology 1991;35(4):857-62. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90426-e](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90426-e).
- Pontes JHF, Silva KCF, Basso AC, Rigo AG, Ferreira CR, Sanches BV, Seneda MM. Large-scale in vitro embryo production and pregnancy rates from Bos taurus and Bos indicus donors. Theriogenology 2010; 74(8):1349–1355. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2010.06.004>.
- Purohit GN. Recent developments in the diagnosis and therapy of repeat breeding cows and buffaloes. CAB Rev: Perspect Agric Vet Sci, Nutr Nat Res 2008; 3(62):1-34. <https://doi.org/10.1079/PAVSNNR20083062>.
- Silvia WJ, Hatler TB, Nugent AM, Laranja da Fonseca LF. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. Domest Anim Endocrinol 2002; 23(1-2):167-77. [https://doi.org/10.1016/s0739-7240\(02\)00154-6](https://doi.org/10.1016/s0739-7240(02)00154-6).
- Stublings RB, Walton JS. Effect of ultrasonically-guided follicle aspiration on estrous cycle and follicular dynamics in Holstein cows. Theriogenology 1995; 43(4):705-12. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(95\)00013-x](https://doi.org/10.1016/0093-691x(95)00013-x).

- Suresh A, Saran S, Umamageswari J, Kavitha K, Thangapandian M, Arunmozhi N, Sarath T. Mucometra due to Follicular Cyst with Cystic Dilation of Endometrial Glands in a Holstein Friesian Crossbred Cow. *Int J Livest Res* 2020;10(4):100-103.
- van der Schans A, Van der Westerlaken LAJ, de Wit AAC, Eyestone WH, de Boer HA. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. *Theriogenology* 1991; 35(1):288. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(91\)90264-e](https://doi.org/10.1016/0093-691x(91)90264-e).
- Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 2006;46(2):105-19. <https://doi.org/10.1051/rnd:2006003>.
- Viana JHM, Ferreira ADM, Sá WFD, Camargo LSDA. Follicular dynamics in zebu cattle. *Pesq Agropec Br* 2000; 35(12):2501–2509. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2000001200021>.
- Viana JHM, Nascimento AA, Pinheiro NL, Ferreira AM, Camargo LSA, Sá WF, Marques Júnior AP. Characterization of tissue damages after ovum pick-up in bovine. *Pesq Vet Bras* 2003; 23(3): 119-124. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2003000300004>.
- Viana JHM, Camargo LSA, Nascimento AA, Ferreira AM, Ferreira JF, Marques Junior AP. Consequences of repeated ultrasound-guided follicle aspiration of the ovaries of Gir (*Bos indicus*) cows. *Reprod Fertil Develop* 2006; 18:257-257. <https://doi.org/10.1071/RDv18n2Ab299>.
- Viana JHM, Pereira NES, Faria OAC, Dias LRO, Oliveira ER, Fernandes CAC, Siqueira LGB. Active immunization against GnRH as an alternative therapeutic approach for the management of *Bos indicus* oocyte donors diagnosed with chronic cystic ovarian disease. *Theriogenology* 2021; 172:133–141. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2021>.
- Zhou F, Shi LB, Zhang SY. Ovarian Fibrosis: A Phenomenon of Concern. *Chinese Medical Journal* 2017;130(3):365-371. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.198931>.

**CAPÍTULO 3**

**EFEITO DO TRATAMENTO COM CÉLULAS-TRONCO  
MESENQUIMAIOS OU VESÍCULAS EXTRACELULARES SOBRE AS  
CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS OVARIANAS EM FÊMEAS  
BOVINAS UTILIZADAS COMO DOADORAS DE OÓCITOS**

## RESUMO

As células-tronco mesenquimais (CTM) possuem propriedades regenerativas, imunomoduladoras e anti-inflamatórias, sendo amplamente investigadas em modelos de falência ovariana. Além de restaurar a função ovariana e preservar a morfologia folicular, essas células podem exercer efeitos benéficos por meio da liberação de vesículas extracelulares (VEs) com potencial terapêutico. Este capítulo descreve as características histológicas dos ovários de fêmeas bovinas da raça Nelore, utilizadas como doadoras de oócitos, após tratamento com CTM ou VEs derivadas de CTM. Foram coletados ovários de 16 vacas da raça Nelore, submetidas previamente à injeção intraovariana de solução salina à 0,9%, CTM, VEs derivadas de CTM ou hidrogel (veículo) em protocolo para avaliação da produção *in vitro* de oócitos e embriões. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos experimentais: grupo controle (aplicação de solução salina 0,9%), grupo CTM, grupo VEs e grupo hidrogel (veículo). As amostras ovarianas foram submetidas à análise histopatológica, com avaliação da densidade folicular (folículos primordiais, primários, secundários, antrais e atrésicos), da espessura da túnica albugínea e da proporção volumétrica dos componentes teciduais (tecido conjuntivo, folículos, tecido luteal e vasos sanguíneos). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos para a densidade de folículos primordiais ( $P=0,6007$ ), primários ( $P=0,5492$ ), antrais ( $P=0,2722$ ) e atrésicos ( $P=0,3673$ ). No entanto, houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) na densidade de folículos secundários, sendo o grupo hidrogel (G4) o que apresentou maior diferença em relação ao grupo controle. A análise da proporção volumétrica dos tecidos ovarianos — tecido conjuntivo, folículos, tecido luteal e vasos sanguíneos — não demonstrou diferenças significativas entre os grupos ( $P=0,9026$ ;  $P=0,9581$ ;  $P=0,6485$  e  $P=0,6251$ , respectivamente). Entre os grupos experimentais, não houve diferença estatística significativa com relação à espessura da túnica albugínea ( $P=0,1282$ ). A aplicação intraovariana de CTM e VE-CTM em bovinos não apresenta aparentes impactos negativos sobre a composição tecidual ovariana. Contudo, o veículo utilizado pode mascarar potenciais respostas benéficas ao tratamento.

Palavras-chave: aspiração folicular, ovário bovino, células tronco mesenquimais, vesículas extracelulares, histopatologia.

## **ABSTRACT**

Mesenchymal stem cells (MSCs) have regenerative, immunomodulatory and anti-inflammatory properties and have been widely investigated in models of ovarian failure. In addition to restoring ovarian function and preserving follicular morphology, these cells can exert beneficial effects by releasing extracellular vesicles (EVs) with therapeutic potential. This chapter describes the histological characteristics of the ovaries of Gir cattle used as oocyte donors after treatment with MSC or MSC-derived EVs. Ovaries were collected from 16 Nelore cows which had previously undergone intraovarian injection of 0.9% saline solution, MSC, MSC-derived EVs or hydrogel (vehicle) in a protocol to evaluate the *in vitro* production of oocytes and embryos. The animals were randomly assigned to four experimental groups: the control group (application of 0.9% saline solution), the MSC group, the EV group, and the hydrogel (vehicle) group. The ovarian samples were submitted to histopathological analysis, with assessment of follicular density (primordial, primary and secondary follicles), the thickness of the tunica albuginea and the volumetric proportion of tissue components (connective tissue, follicles, luteal tissue and blood vessels). No statistically significant differences were observed between the groups for the density of primordial ( $P=0.6007$ ) and primary follicles ( $P=0.5492$ ). However, there was a significant difference ( $P<0.05$ ) in the density of secondary follicles, with the hydrogel group (G4) showing the greatest number compared to the control group. Analysis of the volumetric proportion of ovarian tissues - connective tissue, follicles, luteal tissue and blood vessels - showed no significant differences between the groups ( $P=0.9026$ ;  $P=0.9581$ ;  $P=0.6485$  and  $P=0.6251$ , respectively). There was no statistically significant difference between the experimental groups with regard to the thickness of the tunica albuginea ( $P=0.1282$ ). The intraovarian application of MSCs and MSC-EVs in cattle has no apparent negative impact on the ovarian tissue composition. However, the vehicle used can overshadow the potential beneficial effects of the treatment.

**Key words:** follicular aspiration, bovine ovary, mesenchymal stem cells, extracellular vesicles, histopathology.

## INTRODUÇÃO

As células-tronco mesenquimais (CTM) são células não hematopoiéticas encontradas primariamente na medula óssea, caracterizadas pela capacidade de autorrenovação, diferenciação e contribuição para a regeneração de tecidos mesenquimais como ossos, cartilagens, músculos, ligamentos, tendões e tecido adiposo (Friedenstein et al., 1976; Chamberlain et al., 2007; Gugjoo et al., 2018). Essas propriedades tornam as CTM candidatas potencialmente ideais para aplicações em engenharia de tecidos (Chamberlain et al., 2007).

Células-tronco derivadas de tecido adiposo podem ser facilmente obtidas em grandes quantidades por meio de coleta minimamente invasiva, sendo, por isso, excelentes candidatas ao uso terapêutico (Chamberlain et al., 2007; Lu et al., 2014). Além da multipotência, as CTM possuem propriedades imunomoduladoras, anti-inflamatórias, tropismo por tecidos inflamados e baixa imunogenicidade. Adicionalmente, há relatos de que as CTM desempenham um papel importante na sobrevivência dos folículos e na redução da apoptose de células ovarianas (Fu et al., 2008; Abd-Allah et al., 2013; Mohamed et al., 2018). A aplicação de CTM tem se mostrado eficaz no tratamento — e até na reversão — da infertilidade feminina em modelos animais com falência ovariana induzida (Abd-Allah et al., 2013; Mohamed et al., 2018; Liu et al., 2019; Yoon et al., 2020).

Em bovinos, estudos anteriores concluíram que a injeção intraovariana com CTM é segura e pode melhorar a produção e a qualidade dos óócitos, representando uma alternativa promissora para melhorar as taxas da PIVE (Peixer et al., 2020; Malard et al., 2020; Peixer et al., 2023). Apesar da escassez de estudos específicos sobre o uso de CTM no tratamento de disfunções ovarianas em bovinos, pesquisas em outras espécies demonstram resultados promissores. Modelos murinos, por exemplo, indicam que as CTM são capazes de restaurar a função ovariana, preservar a morfologia folicular e reduzir a apoptose celular em situações de falência ovariana induzida (Fu et al., 2008; Abd-Allah et al., 2013; Elfayomy et al., 2016; Mohamed et al., 2018).

Esses efeitos benéficos são atribuídos tanto à ação direta das células quanto à liberação de microvesículas e exossomos com propriedades regenerativas (van Niel et al., 2018). Embora os estudos ainda sejam incipientes, as investigações sugerem que as CTM e suas vesículas extracelulares (VE-CTM) podem ter aplicações

reprodutivas relevantes, especialmente em biotecnologias da reprodução, ao induzirem a proliferação e migração de células do estroma ovariano, beneficiando a fertilidade por gerar a melhoria do desenvolvimento folicular de vacas com lesões decorrentes de múltiplas sessões de OPU (Barcelos et al., 2024).

Diante desse cenário, este capítulo tem como objetivo avaliar o efeito do tratamento com CTM e VE-CTM sobre a população folicular e características histológicas do ovário de fêmeas bovinas da raça Nelore utilizadas como doadoras de óócitos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### **1. Avaliação do efeito do tratamento com CTM e VEs-CTM sobre as características histológicas e populações foliculares em ovários de animais da raça Nelore.**

Os ovários foram recuperados após a ovariectomia de doadoras previamente utilizadas para avaliação do efeito *in vivo* da injeção intra-ovariana de células tronco mesenquimais (CTM) ou vesículas extracelulares oriundas de CTMs (VEs-CTM) sobre a produção de óócitos e de embriões *in vitro* (Malard., 2020). Vacas da raça Nelore (n=16), sem lesões prévias no trato reprodutivo e com histórico de fertilidade conhecido, foram submetidas a três sessões de OPU, com intervalos de 15 dias entre cada sessão. Imediatamente após a terceira sessão de OPU, as vacas foram distribuídas aleatoriamente em 4 grupos experimentais e receberam os seguintes tratamentos:

Grupo 1 (G1): Grupo Controle – Aplicação de solução salina a 0,9%

Grupo 2 (G2): Aplicação de  $2,5 \times 10^6$  de CTM em hidrogel

Grupo 3 (G3): Aplicação das VE oriundas do cultivo de  $2,5 \times 10^6$  de CTM em hidrogel

Grupo 4 (G4): Aplicação de 1,0 mL de hidrogel (veículo)

As células tronco mesenquimais e vesículas extracelulares (VE-CTM) utilizadas neste estudo foram fornecidas pela empresa BIO Biotecnologia LTDA. Elas foram obtidas a partir de tecido adiposo bovino, processadas por isolamento, caracterização, imunofenotipagem, cultivo e congelamento, conforme o procedimento descrito por Malard (2020), as vesículas foram separadas pelo método de ultrafiltração. O hidrogel utilizado como veículo foi fornecido pelo Laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Cenargen, sendo de composição sujeita a proteção intelectual. O uso do hidrogel

mostrou-se necessário, em ensaios preliminares, para reter as CTM e VE no local da aplicação.

Quinze dias após a injeção dos tratamentos, os animais foram submetidos a três sessões adicionais de OPU, com intervalo de 15 dias entre cada uma. Quatro animais de cada grupo foram ovariectomizados. Os ovários foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% tamponado durante 24 horas e em seguida foram mantidos em álcool 70%. A inclusão foi realizada em paraplast e as amostras foram seccionadas em micrótomo (7 µm) sendo obtidas 20 secções por ovário. Feito isso, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) e a avaliação da densidade folicular foi realizada em microscopia de luz 40x (Coleman P104 LED).

Os folículos foram classificados segundo critérios histológicos descritos por Pereira et al. (2020) em cinco classes: primordiais (uma camada de células pré-granulosa pavimentosas), primários (camada única de células da granulosa cuboidais), secundários (mais de uma camada de células da granulosa sem antro visível), antrais (folículos com antro folicular) e atrésicos (sinais morfológicos de morte, como picnose, fragmentação e desintegração celular) (Figura 5).

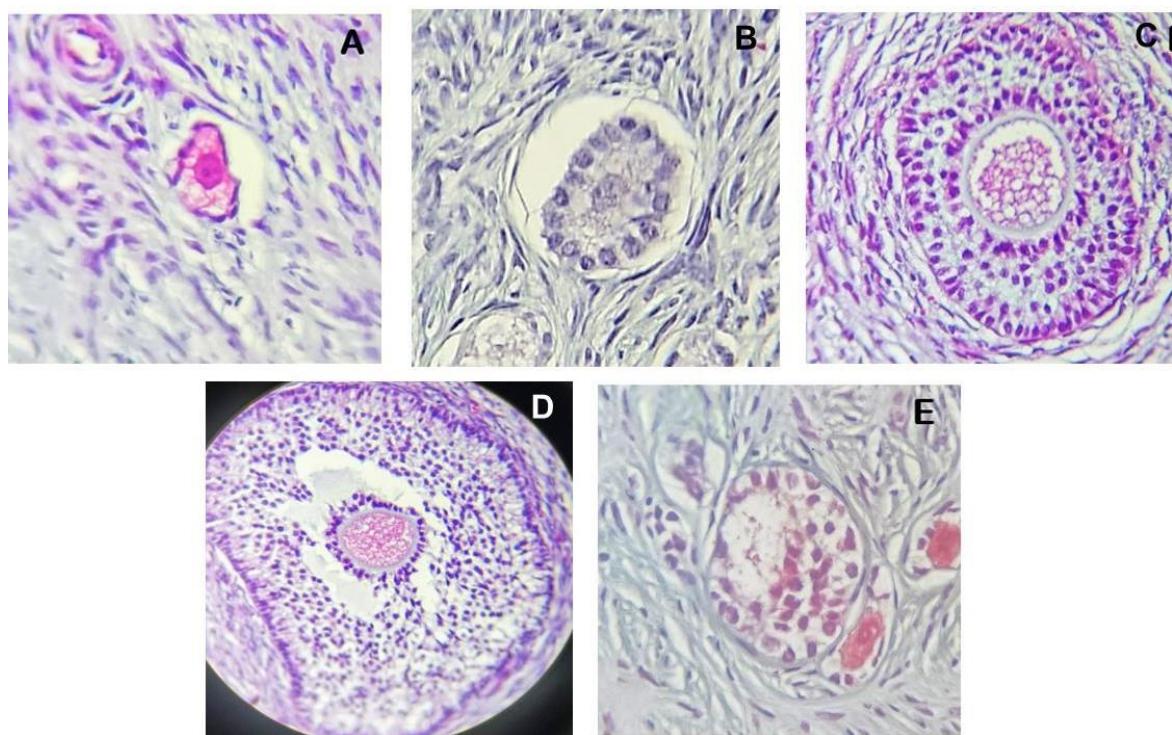


Figura 5. Classificação folicular. A: Folículo primordial; B: Folículo primário; C: Folículo secundário; D: Folículo antral; E: Folículo atrésico. (HE, Obj. 40X).

Para cada ovário, foi avaliada uma área de 1000 mm<sup>2</sup>, sendo quantificados o número de folículos de cada uma das classes descritas anteriormente para a obtenção do número de folículos por mm<sup>2</sup>. Foram analisadas 169 lâminas histológicas, totalizando 654.629 campos avaliados. Para o cálculo da densidade folicular por 1000 mm<sup>2</sup> foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Campos avaliados em } 1000 \text{ mm}^2 = \frac{\text{Número de campos por lâmina} \times 0,24}{1000}$$

$$\rho \text{ de folículo da categoria avaliada em } 1000 \text{ mm}^2 = \frac{\text{Total de folículos da categoria}}{\text{Campos avaliados em } 1000 \text{ mm}^2}$$

OBS: O valor de 0,24 corresponde a área em mm<sup>2</sup> do campo de visão da objetiva de 40x.

As análises de espessura da túnica albugínea e da proporção volumétrica dos diferentes componentes histológicos dos ovários foram avaliadas por meio de fotomicrografias obtidas a partir das lâminas histológicas previamente processadas. As imagens foram capturadas em microscópio óptico acoplado a um sistema de aquisição digital (Moticam A5, Motic, Vancouver, Canada) e analisadas utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Maryland, EUA) (Schindelin et al., 2012).

A espessura da túnica albugínea foi mensurada em µm a partir de medições lineares realizadas em diferentes pontos da túnica albugínea (Figura 6). Foram capturadas 10 fotomicrografias de cada lâmina histológica correspondente a cada animal dos 4 grupos experimentais, salvas em formato jpg. Aplicou-se a ferramenta de mensuração do ImageJ previamente calibrada com base em escala conhecida em µm.

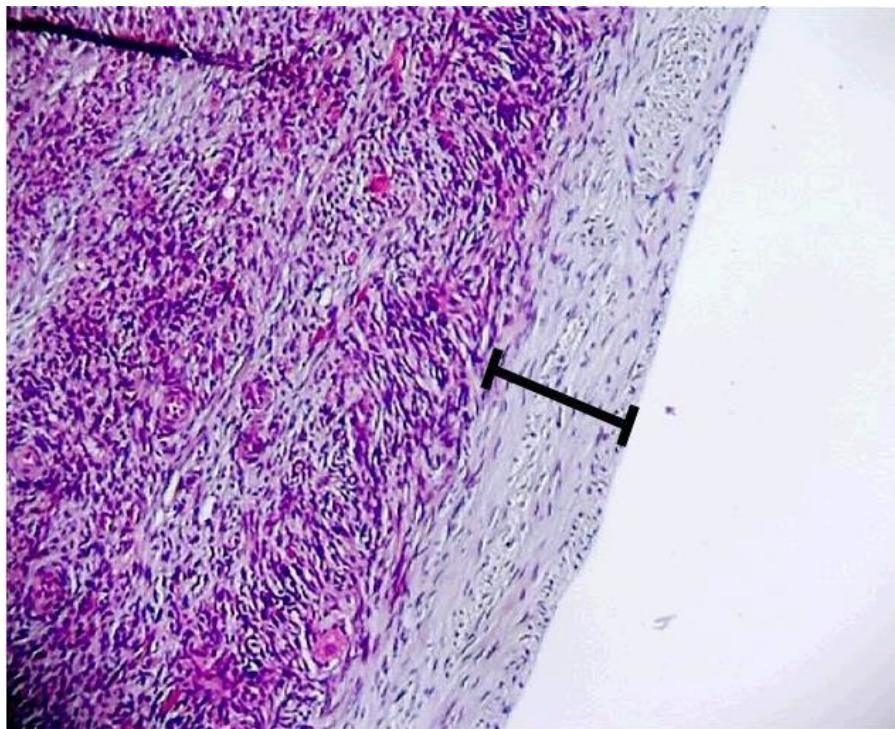


Figura 6: Exemplo de fotomicrografia utilizada para mensuração da espessura da túnica albugínea. Traço: representação da extensão da estrutura. (HE, Obj. 40X).

A proporção volumétrica dos componentes histológicos do ovário foi determinada por meio da análise de fotomicrografias – obtidas 2 fotomicrografias por lâmina de cada animal dos 4 grupos experimentais, em regiões aleatórias, salvas em formato .jpg – utilizando o software ImageJ . Para essa quantificação, foi aplicada a ferramenta Grid (grade) para sobrepor um sistema de pontos à imagem histológica, permitindo a contagem sistemática das diferentes estruturas teciduais.

A contagem dos pontos que interceptavam cada componente histológico avaliado (Figura 7) – tecido conjuntivo, folículos ovarianos, corpo lúteo e vasos sanguíneos – foi realizada utilizando o *plugin* Cell Counter. A proporção volumétrica de cada estrutura foi determinada pelo princípio estereológico, onde a fração volumétrica é proporcional à fração de pontos ocupados por determinada estrutura em relação ao total de pontos da grade. Os resultados foram expressos em porcentagem, representando a contribuição relativa de cada componente no volume total do tecido analisado (Noorafshan A, 2014; Sadeghinezhad et al., 2021; Dağdeviren & Yolcu et al., 2024).

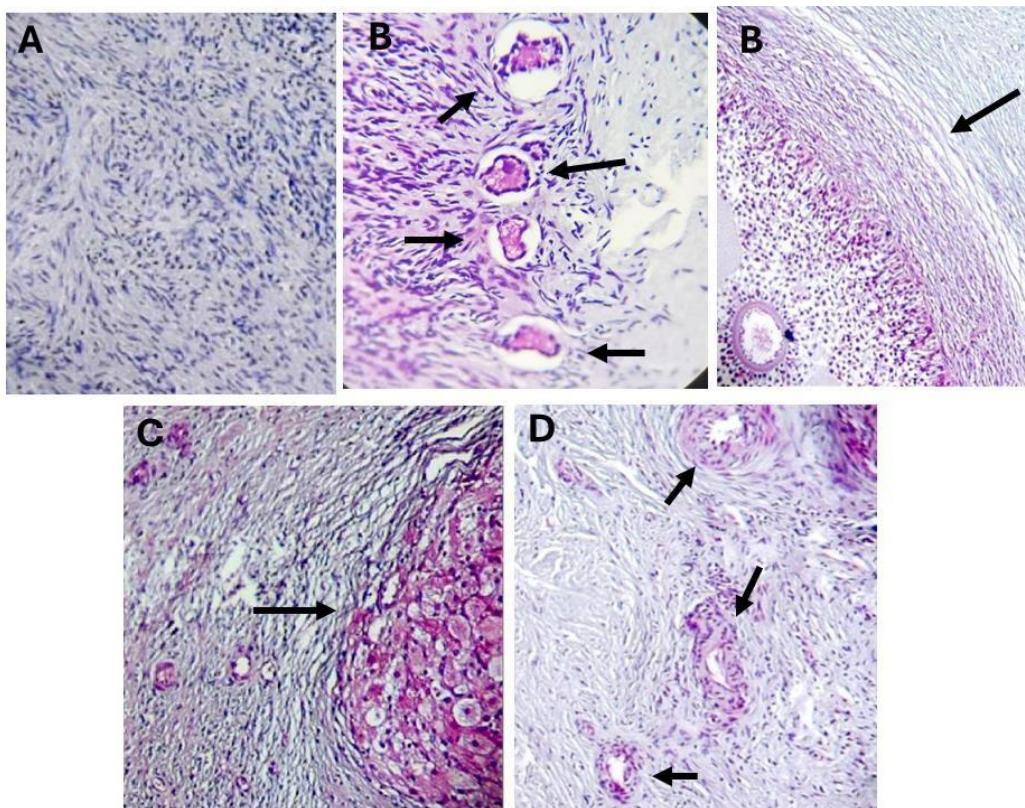


Figura 7. Componentes ovarianos analisados no estudo de proporção volumétrica, indicados por setas. A: Tecido conjuntivo; B: Folículos ovarianos; C: Corpo lúteo; D: Vasos sanguíneos. (HE, Obj. 40X).

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Católica de Brasília (Protocolo CEUA-UCB 003/2018).

## 2. Análises estatísticas

Os valores obtidos nas diferentes análises foram testados quanto ao tipo de distribuição e normalidade, utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para dados com distribuição normal, o efeito do tratamento foi avaliado utilizando-se o Proc Mixed do Software SAS (SAS Inc.). Nos demais (número de folículos primordiais e de atrésicos), utilizou-se o Proc Glimmix do SAS, ajustado para distribuição LogNormal. Diferenças entre tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey. Valores de P inferiores a 0,05 foram considerados como estatisticamente significativos. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM (não transformados).

## **RESULTADOS**

### **1. Efeito do uso de CTM ou VE-CTM sobre a população folicular em animais submetidos a OPU**

Os resultados da quantificação das diferentes categorias de folículos analisadas por grupo estão demonstrados na Figura 8. Não houve entre os grupos para a população de folículos primordiais ( $P=0,6007$ ) ou de folículos primários ( $P=0,5492$ ). Contudo, observou-se diferença significativa ( $P<0,05$ ) na densidade de folículos secundários dentre os grupos, sendo o grupo tratado com hidrogel superior ao grupo controle, mas semelhante aos tratados com CTM ou VE-CTM.

Com relação às populações de folículos antrais e atrésicos, não foram observadas diferenças significativas ( $P=0,2722$  e  $P=0,3673$ , respectivamente) entre os grupos tratados e o grupo controle, tal como, no percentual de folículos atrésicos entre os grupos ( $P=0,5688$ ).

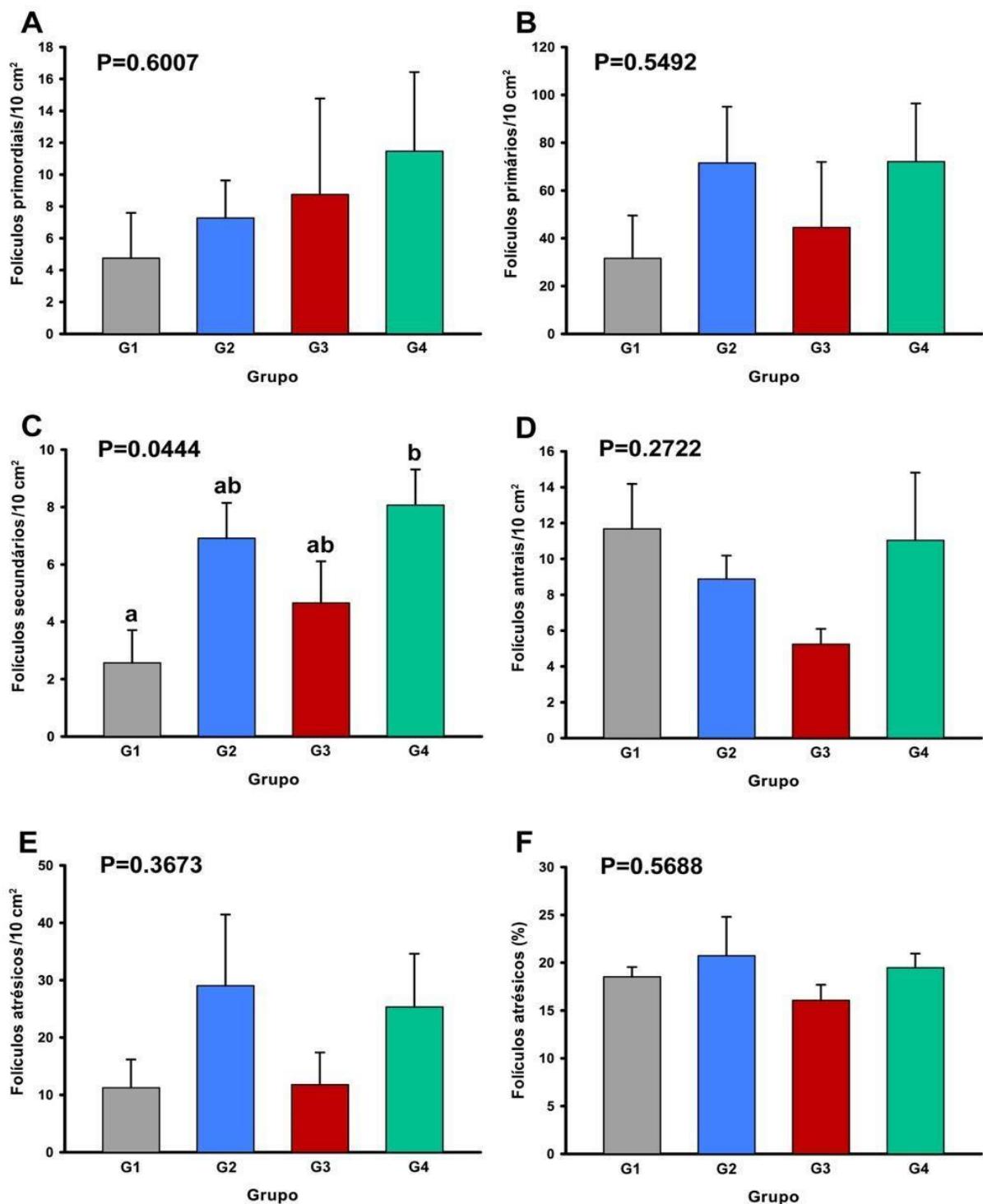


Figura 8. Quantificação da população folicular nos grupos experimentais. A: População de folículos primordiais em 10 cm<sup>2</sup>; B: População de folículos primários em 10 cm<sup>2</sup>; C: População de folículos secundários em 10 cm<sup>2</sup>; D: População de folículos antrais em 10 cm<sup>2</sup>; E: População de folículos atrésicos em 10 cm<sup>2</sup>; F: População de folículos atrésicos em valores percentuais. Grupos tratados com: G1: salina, G2: CTM, G3, VE-CTM, G4: hidrogel.

## 2. Proporção volumétrica dos componentes histológicos ovarianos

Os resultados da análise da proporção volumétrica dos componentes histológicos avaliados nos grupos experimentais estão exibidos na Figura 9. A análise da proporção volumétrica dos tecidos ovarianos — tecido conjuntivo, folículos ovarianos, tecido luteal e vasos sanguíneos — não revelou diferenças significativas entre os grupos ( $P=0,9026$ ;  $P=0,9581$ ;  $P=0,6485$  e  $P=0,6251$ , respectivamente).

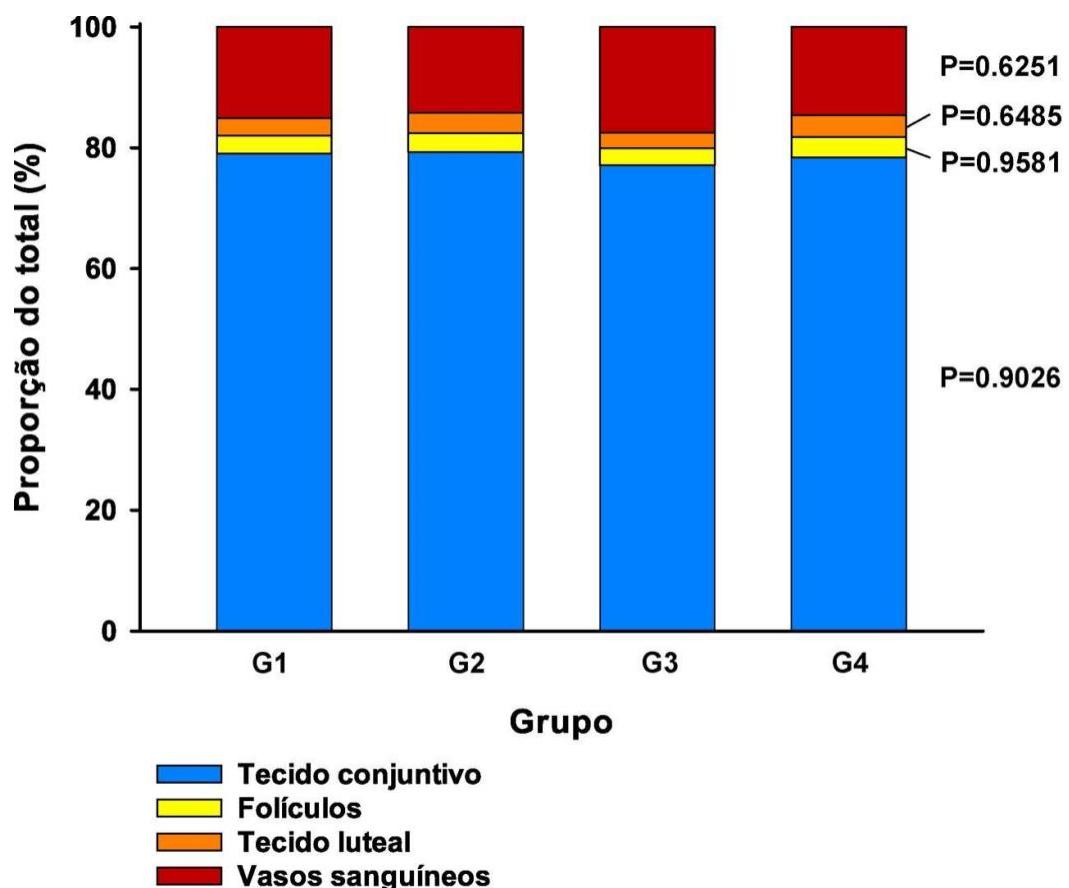


Figura 9. Proporção volumétrica dos componentes ovarianos avaliados. Azul: Tecido conjuntivo; Amarelo: Folículos ovarianos; Laranja: Tecido luteal; Vermelho: Vasos sanguíneos.

### 3. Análise de espessura da túnica albugínea

Entre os grupos experimentais, não houve diferença significativa com relação à espessura da túnica albugínea ( $P= 0,1282$ ). O grupo controle (G1) apresentou maior média de espessura ( $238,9 \pm 21,3 \mu\text{m}$ ), seguido pelos grupos tratados com células-tronco mesenquimais (G2:  $209,5 \pm 11,3 \mu\text{m}$ ), hidrogel (G4:  $205,5 \pm 9,6 \mu\text{m}$ ) e vesículas extracelulares de CTM (G3:  $190,7 \pm 5,5 \mu\text{m}$ ). Os resultados estão apresentados na Figura 10.

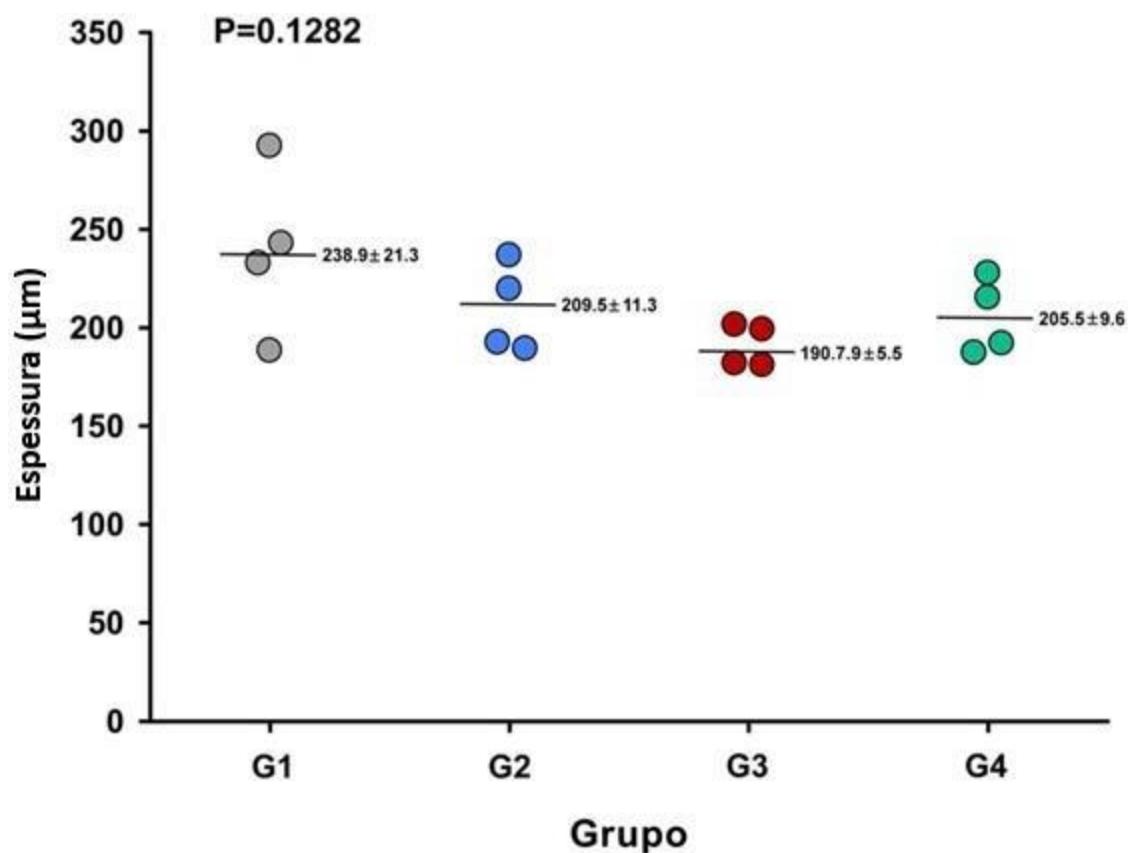


Figura 10. Avaliação da espessura da túnica albugínea entre os grupos experimentais.

## DISCUSSÃO

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tratamento com CTM e VE-CTM sobre a população folicular e características histológicas de vacas utilizadas previamente como doadoras de oócitos.

As terapias com CTM e seus derivados, como as VE-CTM, têm sido propostas como alternativas promissoras para o tratamento de desordens reprodutivas femininas (Zhao et al., 2019; Esfandyari et al., 2020; Liao et al., 2021). A aplicação intraovariana de CTMs em bovinos foi descrita por diversos autores, com evidências que comprovam sua segurança e viabilidade (Peixer et al., 2020; Malard et al., 2020; Carvalho et al., 2021; Peixer et al., 2023; Sarvari et al., 2024).

Nesse contexto, as VE-CTM surgem como uma alternativa promissora às próprias CTMs, apresentando efeitos terapêuticos semelhantes, porém com vantagens adicionais. Entre essas vantagens, destacam-se a menor imunogenicidade, maior capacidade de penetração nos tecidos-alvo, facilidade de armazenamento e maior estabilidade biológica (Zhang et al., 2016; Eleuteri & Fierabracci, 2019). O uso das VE-CTM no tratamento da infertilidade feminina tem sido amplamente investigado, com resultados promissores em diferentes modelos experimentais (Huang et al., 2018; Liao et al., 2021; Izadi et al., 2022; Barcelos et al., 2024).

Neste estudo, diferentemente de abordagens anteriores, foram avaliadas as características histológicas — como a espessura da túnica albugínea e a proporção volumétrica dos principais tecidos ovarianos —, além da população folicular dos ovários de doadoras de oócitos tratadas com CTM ou VE-CTM. A quantificação da população folicular revelou que a única categoria com diferença estatisticamente significativa ( $P<0,05$ ) entre os grupos experimentais, foi a de folículos secundários. O G4 (tratado com hidrogel), exibiu a maior média de folículos secundários, quando comparado ao controle, o que sugere uma possível interferência do veículo sobre a dinâmica folicular nesta categoria. Os grupos tratados com CTM e VE-CTM (G2 e G3, respectivamente), também apresentaram médias superiores ao controle, porém sem efeito estatisticamente significativo.

A ausência de diferença significativa nos demais estágios foliculares — primordiais, primários, antrais e atrésicos — difere do resultado observado por Huang et al., (2018), quando utilizadas VE-CTMs num modelo de falência ovariana murino. Deve-se levar em consideração que tanto o veículo, quanto a proporção de células

injetadas quando comparadas ao tamanho do modelo utilizado diferem bastante. A ausência de efeito significativo observado nos grupos G2 e G3 em relação ao controle poderia estar relacionada com a ação citotóxica do veículo (hidrogel) sobre as CTM, constatada por Malard. (2020). Contudo, a média do grupo tratado com CTM foi numericamente mais próxima do G4 que a do tratado com VE-CTM, que foram isoladas antes da exposição ao veículo. Novos ensaios são necessários para estabelecer um protocolo mais efetivo para aplicação de CTM e VE-CTM com outros veículos para tratamento de condições ovarianas na espécie bovina.

A espessura da túnica albugínea foi numericamente menor no grupo G3 (VE-CTM,  $190,7 \pm 5,5 \mu\text{m}$ ), em contraste com o grupo controle ( $238,9 \pm 21,3 \mu\text{m}$ ), porém sem caracterizar diferença estatística ( $P = 0,1282$ ). A proporção volumétrica tecidual dos ovários manteve uma distribuição semelhante entre todos os tratamentos. Na análise da proporção volumétrica dos tecidos ovarianos, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos ( $P=0,9026$ ). Esses resultados podem sugerir que o número de sessões de OPU utilizadas não foi suficiente para comprometer de forma mais ampla a arquitetura geral do órgão e, dessa forma, também limitando o potencial efeito dos tratamentos. Por outro lado, também não se evidenciou efeitos adversos aparentes sobre a composição volumétrica. De fato, Peixer et al. (2023) descreveram que a aplicação de CTM no córtex ovariano de vacas saudáveis não trouxe prejuízos e nem alterou parâmetros reprodutivos (imagem dos ovários na ultrassonografia, variação significativa no número de ovócitos coletados e na taxa de produção de embriões), sendo considerada uma técnica segura.

Dessa forma, no presente estudo, não foi possível observar o efeito esperado das VE-CTM na remodelação da matriz extracelular e imunomodulação, inibindo a fibrose tecidual nos ovários. Esses efeitos estão associados aos mecanismos das CTM e VE-CTM já descritos na literatura como: angiogênese, reparação tecidual, efeitos anti-inflamatórios e antifibróticos, e imunomodulação (Zhao et al., 2016; Zhang et al., 2016; Zhao et al., 2019). As VE-CTM contêm miRNAs, mRNAs, citocinas, fatores de crescimento, proteínas e lipídios com efeitos semelhantes aos das CTMs, mas com menor risco imunológico e melhor capacidade de penetração (Phinney & Pittenger, 2017).

Os resultados da aplicação de CTM ou VE-CTM em ovários de doadoras bovinas, lesionados pela aspiração folicular, sobre as características histológicas dos ovários não apresentam relação aparente com os resultados na PIVE relatados na

literatura. Malard et al. (2020) observaram maior produção de oócitos, embriões e blastocistos expandidos após o tratamento com CTM em animais com lesões ovarianas agudas induzidas pela OPU. O mesmo efeito, contudo, não foi observado em animais com lesões crônicas e patologias como a DOC, nos quais o dano provavelmente já era irreversível. De fato, o efeito do uso de CTM em animais utilizados como doadoras para a PIVE ainda é controverso. Sarvari et al., (2024) não observaram melhora nos resultados da PIVE após tratamento com CTM ou seu Meio Condicionado (ConM) em ovários de fêmeas taurinas previamente submetidas à OPU. Já Barcelos et al. (2024), verificaram que animais tratados com VE-CTM mantiveram a produção de oócitos e aumentaram a produção de embriões *in vitro*, em comparação ao grupo controle (tratado apenas com veículo). Essa inconsistência pode estar relacionada às variações metodológicas entre os trabalhos, como forma e intensidade na indução das lesões, concentração de CTM ou VE utilizada, ou até no veículo, como evidenciado no presente trabalho.

Algumas condições como o tamanho amostral reduzido e o curto período de avaliação pós-tratamento com CTM e VE-CTM também podem ter influenciado nos resultados deste estudo. Avaliações do tratamento com CTM e VE-CTM à longo prazo nos animais com injúrias agudas e desenvolvimento de um veículo mais inerte em relação as células e vesículas devem ser considerados em estudos posteriores.

## CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que a aplicação intraovariana de CTM e VE-CTM em bovinos não causa aparentes impactos negativos ou positivos sobre os ovários e sua composição tecidual. Contudo, o veículo utilizado na aplicação dos tratamentos pode interferir no potencial efeito terapêutico das CTM e VE-CTM.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd-Allah SH, Shalaby SM, Pasha HF, El-Shal AS, Raafat N, Shabrawy SM, Awad HA, Amer MG, Gharib MA, El Gendy EA, Raslan AA, El-Kelawy HM. Mechanistic action of mesenchymal stem cell injection in the treatment of chemically induced ovarian failure in rabbits. *Cytotherapy* 2013;15(1):64-75.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.08.001>.

- Barcelos SM, da Silva Rosa PM, Moura ABB, Villarroel CLP, Bridi A, Bispo ECI, Carvalho JL. Extracellular vesicles derived from bovine adipose-derived mesenchymal stromal cells enhance in vitro embryo production from lesioned ovaries. *Cytotherapy* 2024; 26(10):1141-1151.
- Carvalho JL, Viana JHM, Pogue, R, Malard PF, Brunel HSS, Peixer MAS. Intraovarian injection of allogeneic mesenchymal stem cells: feasibility and safety assessment in bovines. *Cytotherapy* 2021; 23(4):20. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2021.02.061>.
- Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 2007; 25(11):2739-49. <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0197>.
- Dağdeviren T & Yolcu HK. A Brief Overview of Stereology and Morphometry Method in Histology and Biology. *Turkish J Agric-Food Sci Techn* 12(12): 2640-2643, 2024. <https://doi.org/10.24925/turjaf.v12i12.2640-2643.693>.
- Elfayomy AK, Almasry SM, El-Tarhouny SA, Eldomiaty MA. Human umbilical cord blood-mesenchymal stem cells transplantation renovates the ovarian surface epithelium in a rat model of premature ovarian failure: Possible direct and indirect effects. *Tissue Cell* 2016;48(4):370-82. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2016.05.001>.
- Eleuteri S, Fierabracci A. Insights into the Secretome of Mesenchymal Stem Cells and Its Potential Applications. *Int J Mol Sci* 2019;20(18):4597. <https://doi.org/10.3390/ijms20184597>.
- Esfandyari S, Chugh RM, Park HS, Hobeika E, Ulin M, Al-Hendy A. Mesenchymal Stem Cells as a Bio Organ for Treatment of Female Infertility. *Cells* 2020;9(10):2253. <https://doi.org/10.3390/cells9102253>.
- Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 1976;4(5):267-74. PMID: 976387.
- Fu X, He Y, Xie C, Liu W. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation improves ovarian function and structure in rats with chemotherapy-induced ovarian damage. *Cytotherapy* 2008;10(4):353-63. <https://doi.org/10.1080/14653240802035926>.
- Gugjoo MB, Amarpal, Fazili MR, Shah RA, Sharma GT. Mesenchymal stem cell: Basic research and potential applications in cattle and buffalo. *J Cell Physiol* 2019. Jun;234(6):8618-8635. <https://doi.org/10.1002/jcp.27846>.

Huang B, Lu J, Ding C, Zou Q, Wang W, Li H. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells improve ovary function of premature ovarian insufficiency by targeting SMAD. Stem Cell Res Ther 2018;9(1):216. <https://doi.org/10.1186/s13287-018-0953-7>.

Izadi M, Rezvani ME, Aliabadi A, Karimi M, Aflatoonian B. Mesenchymal stem cells-derived exosomes as a promising new approach for the treatment of infertility caused by polycystic ovary syndrome. Front Pharmacol 2022;13:1021581. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.1021581>.

Liao Z, Liu C, Wang L, Sui C, Zhang H. Therapeutic Role of Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles in Female Reproductive Diseases. Front Endocrinol 2021;12:665645. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.665645>.

Liu R, Zhang X, Fan Z, Wang Y, Yao G, Wan X, Liu Z, Yang B, Yu L. Human amniotic mesenchymal stem cells improve the follicular microenvironment to recover ovarian function in premature ovarian failure mice. Stem Cell Res Ther 2019;10(1):299. <https://doi.org/10.1186/s13287-019-1315-9>.

Lu T, Xiong H, Wang K, Wang S, Ma Y, Guan W. Isolation and characterization of adipose-derived mesenchymal stem cells (ADSCs) from cattle. Appl Biochem Biotechnol 2014;174(2):719-28. <https://doi.org/10.1007/s12010-014-1128-3>.

Malard PF. Estudo pré-clínico do uso de células tronco mesenquimais para o tratamento de lesões ovarias. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Genômicas e Biotecnologia). 2020. P 83-106. Universidade Católica de Brasília, Brasília.

Malard PF, Peixer MAS, Grazia JG, Brunel HDSS, Feres LF, Villarroel CL, Siqueira LGB, Dode MAN, Pogue R, Viana JHM, Carvalho JL. Intraovarian injection of mesenchymal stem cells improves oocyte yield and in vitro embryo production in a bovine model of fertility loss. Sci Rep 2020;10(1):8018. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-64810-x>

Mohamed SA, Shalaby SM, Abdelaziz M, Brakta S, Hill WD, Ismail N, Al-Hendy A. Human Mesenchymal Stem Cells Partially Reverse Infertility in Chemotherapy-Induced Ovarian Failure. Reprod Sci 2018;25(1):51-63. <https://doi.org/10.1177/1933719117699705>.

Noorafshan A. Stereology as a valuable tool in the toolbox of testicular research. Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger 2014; 196(1):57–66. <https://doi.org/10.1016/j.aanat.2012.07.008>.

Peixer MAS, Malard PF, Carvalho JL, Dode MAN, Viana JHM, Pogue R. Use of mesenchymal stem cell treatment to improve oocyte yield and in vitro embryo production in cattle. *Reprod Fertil Develop* 2020; 32:214-215. <https://doi.org/10.1071/RDv32n2Ab174>.

Peixer, MAS, Malard PF, Brunel HSS, Viana JHM, Alencar-Silva T, Carvalho JL, Pogue R. Clinical safety of bovine intra-ovarian application of allogeneic mesenchymal stem cells. *Br J Sci* 2023; 2:87-97. <https://doi.org/10.14295/bjs.v2i9.383>.

Pereira LAAC, Nascimento BR, Jorge EC, Segatelli TM, Coutinho LL, Viana JHM, Campos-Junior PHA. Vitrification leads to transcriptomic modifications of mice ovaries that do not affect folliculogenesis progression. *Reprod Biol* 2020;20(2):264-272. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2020.02.001>.

Phinney DG, Pittenger MF. Concise Review: MSC-Derived Exosomes for Cell-Free Therapy. *Stem Cells*. 2017 Apr;35(4):851-858. <https://doi.org/10.1002/stem.2575>. Epub 2017 Mar 10. Erratum in: *Stem Cells* 2017;35(9):2103. <https://doi.org/10.1002/stem.2626>.

Sadeghinezhad J, Ganji Z, Chaleshtori SS, Bojazadeh H, Asl MA, Khomejini AB, Roomiani E, Hosseini M, de Silva M. Morphometric study of the testis in sheep embryos using unbiased design-based stereology. *Anat Histol Embryol* 2021; 50(6):1026-1033. <https://doi.org/10.1111/ahe.12746>

Sarvari A, Niasari-Naslaji A, Shirazi A, Heidari B, Boroujeni SB, Moradi MH, Naderi MM, Behzadi B, Mehrazar MM, Dehghan MM. Effect of Intra-ovarian Injection of Mesenchymal Stem Cells or its Conditioned Media on Repeated OPU-IVEP Outcomes in Jersey Heifers and Its Relationship with Follicular Fluid Inflammatory Markers. *Avicenna J Med Biotechnol* 2024;16(1):16-28. <https://doi.org/10.18502/ajmb.v16i1.14167>

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P & Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* 2012; 9(7):676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>

van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018;19(4):213-228. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.125>.

- Yoon SY, Yoon JA, Park M, Shin EY, Jung S, Lee JE, Eum JH, Song H, Lee DR, Lee WS, Lyu SW. Recovery of ovarian function by human embryonic stem cell-derived mesenchymal stem cells in cisplatin-induced premature ovarian failure in mice. *Stem Cell Res Ther* 2020.;11(1):255. <https://doi.org/10.1186/s13287-020-01769-6>.
- Zhang B, Yeo RW, Tan KH, Lim SK. Focus on Extracellular Vesicles: Therapeutic Potential of Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles. *Int J Mol Sci* 2016;17(2):174. <https://doi.org/10.3390/ijms17020174>.
- Zhao Q, Ren H, Han Z. Mesenchymal stem cells: Immunomodulatory capability and clinical potential in immune diseases. *J Cell Immunother* 2016; 2:3–20. <https://doi.org/10.1016/j.jocit.2014.12.001>.
- Zhao YX, Chen SR, Su PP, Huang FH, Shi YC, Shi QY, Lin S. Using Mesenchymal Stem Cells to Treat Female Infertility: An Update on Female Reproductive Diseases. *Stem Cells Int* 2019;2019:9071720. <https://doi.org/10.1155/2019/9071720>.